

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	3
2.1. Natriumhypochlorit	5
2.1.1. Allgemeine Eigenschaften und Wirkung	5
2.1.2. <i>in vivo</i> Versuche mit Natriumhypochlorit	6
2.1.3. <i>in vitro</i> Versuche mit Natriumhypochlorit.....	7
2.1.4. <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Versuche zum Vergleich von Natriumhypochlorit mit anderen Desinfektionsmitteln	11
2.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	14
2.2.1. Allgemeines zum Bakterium <i>Enterococcus faecalis</i>	14
2.2.2. <i>in vivo</i> Studien zum <i>Enterococcus faecalis</i> in der Endodontie	15
2.2.3. <i>in vitro</i> Studien zum <i>Enterococcus faecalis</i> in der Endodontie	16
2.3. Natriumthiosulfat	17
2.4. <i>Bacillus subtilis</i>	18
3. Fragestellung	20
4. Material und Methode	21
4.1. Eingesetzter Mikroorganismus.....	21
4.2. Testmaterialien.....	21
4.3. Nährmedien.....	21
4.4. Inkubation der <i>Enterococcus faecalis</i> Arbeitskultur.....	22
4.5. Sicherheitsvorkehrungen	22
4.6. Herstellung einer Gefrierkultur	22
4.7. Vorbereitung einer Arbeitskultur	23
4.8. Herstellung der Wurzelstücke	24
4.8.1. Gewinnung der Rinderzähne.....	24
4.8.2. Aufbereitung der Rinderzähne	24
4.9. Versuchsablauf	26
4.9.1. Versuchstag 1	27
4.9.2. Versuchstag 2	29
4.9.3. Versuchstag 3	30
4.9.4. Versuchstag 4	30
4.9.5. Versuchstag 5	30
4.9.6. Versuchstag 6	30
4.10. Versuchstag 7, Versuchsende.....	31
4.10.1. Desinfektion	31

4.10.2. Herstellung der Zahnstückhälften	32
4.10.3. Probengewinnung	33
4.10.4. Wachstumskulturen	38
4.10.5. Kolonien.....	38
4.11. Datenerhebung und statistische Analyse.....	38
4.11.1. Auszählen der koloniebildenden Einheiten.....	38
4.11.2. Statistische Auswertung	39
Die erfassten Daten wurden in eine computerlesbare Form überführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS 15.0 für Windows. Die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde mit SPSS SigmaPlot 8.0 durchgeführt.	39
4.12. Vorbereitung der Proben für die rasterelektronenmikroskopische Visualisierung	39
4.13. Testung der Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden.....	40
5. Ergebnisse.....	41
5.1. Absolute Kolonienzahlen.....	41
5.1.1. Sterilkontrollen.....	41
5.1.2. Infektionskontrollen	41
5.2. Relative Kolonienzahlen (log ₁₀ -Stufen).....	42
5.3. Rasterelektronenmikroskopische Bilder	43
5.4. Ergebnis der Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden-Testung	47
6. Diskussion.....	48
6.1. Das Testmodell und seine Durchführung.....	48
6.2. Antibakterielle Wirkung des NaOCl.....	49
6.3. Vergleich der beiden Parallelprojekte.....	51
6.4. Unterbindung der <i>Bacillus subtilis</i> Kontamination der Agarplatten	51
7. Zusammenfassung.....	54
8. Anhang.....	56
8.1. Labormaterialien und Reagenzien.....	56
8.2. Abbildungsverzeichnis	61
8.3. Abkürzungsverzeichnis	62
9. Literaturverzeichnis.....	64
10. Lebenslauf	70
11. Danksagung	71

1. Einleitung

Als ein wesentlicher Bestandteil der modernen Zahnerhaltung ist die Endodontie aus der heutigen Zahnheilkunde nicht mehr wegzudenken. Die stetige Forschung auf diesem Gebiet führte in den letzten Jahren und Jahrzehnten zu einem immensen Wissenszuwachs. Durch den Einsatz neuer Hilfsmittel wie beispielsweise Operationsmikroskope zur Auffindung aller vorhandenen Wurzelkanäle oder auch abgebrochener Aufbereitungsinstrumente, Nickel-Titan-Feilen für die Kanalaufbereitung, neue Materialien zur Versorgung von Perforationen und dergleichen mehr konnte das Behandlungsspektrum erweitert und die Erfolgsprognose endodontisch behandelter Zähne konsequent verbessert werden. Doch auch im Hinblick auf die Aufteilung der einzelnen Fachgesellschaften im Bereich der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde wurde der wachsenden Bedeutung dieses Gebietes Rechnung getragen. Als die deutsche Gesellschaft für Zahnerhaltung im Jahr 1986 gegründet wurde, übernahm sie die Aufgabe, das Gebiet der Endodontie mit zu betreuen. Durch die Gründung der Zeitschrift „Endodontie“ im Quintessenzverlag 1992 kam diesem Gebiet der Zahnheilkunde auch in Deutschland immer mehr Bedeutung zu, und schließlich wurde 2002 die deutsche Gesellschaft für Endodontie (DG Endo) als eigenständige Fachgesellschaft gegründet [7].

Als ein Thema von vielen rückt im Zuge der Forschungsarbeit in der Endodontie die adäquate Desinfektion und Spülung der Wurzelkanäle immer wieder in den Fokus. Bis heute ist Natriumhypochlorit (NaOCl), welches seit über 60 Jahren als Spüllösung für diesen Zweck in der Zahnheilkunde verwendet wird, das Mittel der Wahl [46]. Dabei wurde in zahlreichen Studien seine Wirksamkeit in Abhängigkeit von der Konzentration untersucht, um einerseits einen optimalen Nutzen zu erzielen und andererseits eine Schädigung des Organismus zu vermeiden [10; 50; 53; 72].

Ein in der Endodontie wohl bekannter Keim ist der *Enterococcus faecalis*, der insbesondere mit fehlgeschlagenen Wurzelkanalbehandlungen in Verbindung gebracht wird [42]. Er wird daher oft auch als „Problemkeim“ bezeichnet, weshalb der *E. faecalis* nicht selten bei *in vitro* Versuchen zur Erforschung neuer antimikrobieller Spüllösungen und dergleichen mehr Verwendung findet [1; 19; 24; 52].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine *in vitro* Methode [33], welche eine Testung von Desinfektionslösungen anhand von artifiziell infizierten Rinderzahnwurzeln (hier mit

E. faecalis) ermöglichte, weiterentwickelt. Untersucht wurde wiederum die desinfizierende Wirkung von NaOCl in unterschiedlichen Konzentrationen und Einwirkzeiten. Hierbei zeigte sich, dass beide Parameter Einfluss auf die antimikrobielle Wirkung des Desinfektionsmittels haben. Des Weiteren konnte durch eine Modifizierung der Probengewinnung ein Abnehmen der Bakterienkonzentration von der Oberfläche des Wurzelkanals in Richtung Dentin gezeigt werden.

Diese Arbeit ist Teil eines Parallelprojekts, in welchem zwei unterschiedliche endodontische Desinfektionsmethoden getestet wurden. Die vorliegende Arbeit bezieht ihren Schwerpunkt auf die Untersuchung des Natriumhypochlorits als Desinfektionsagens. In der anderen Arbeit [21] wurde anhand desselben Modells die Wirksamkeit der antibakteriellen Photodynamischen Therapie (=aPDT) getestet.

2. Literaturübersicht

2.1. Natriumhypochlorit

2.1.1. Allgemeine Eigenschaften und Wirkung

Hypochloride im Allgemeinen sind stark oxidierende Substanzen. In der Industrie werden sie als eine Alternative zu Chlorgasen für die Chlorierung von Wassertanks, Schwimmbädern, Klimaanlage und Kraftwerken verwendet. In ihrer Anwesenheit korrodieren die meisten Metalle, Ausnahmen bilden hier nur Titan und einige Edelstähle. Kommerziell verwendetes Hypochlorit ist stark alkalisch, hypertonisch und hat typischerweise eine Konzentration zwischen 10% und 14%. Es ist nur begrenzt haltbar und verliert mit der Zeit an Wirkung, besonders unter Temperatureinfluss, Lichtexposition und Kontakt mit Metallionen [15].

Natriumhypochlorit (NaOCl) ist das Natriumsalz der hypochlorigen Säure. Es wird traditionell durch Einleiten von Chlorgas (Cl₂) in Natronlauge (NaOH) hergestellt. Dabei entstehen Kochsalz (NaCl) und Wasser als Nebenprodukte (vgl. Abb. 1) [15].



Abbildung 1: Synthese von Natriumhypochlorit aus Chlorgas und Natronlauge [15]

Alternativ kann es auch durch Elektrolyse einer Natriumchloridlösung gewonnen werden. Hierbei diffundieren Natriumionen durch eine Membran, wo sie mit Wasser zu Natriumhydroxid reagieren. Die Chloridionen verbinden sich zu Chlorgas, welches dann wiederum mit dem Natriumhydroxid zu Natriumhypochlorit, Salz und Wasser reagiert [15].

In der Endodontie wird NaOCl meist als wässrige Lösung in Konzentrationen zwischen 0,5% und 5,25% verwendet [36]. Es wirkt antibakteriell [4; 6; 10; 12; 68; 72], wobei es laut BONSOR *et al.* [10] gegen bestimmte Bakterien wie z.B. den *E. faecalis* nur bedingt wirksam ist. Durch mechanische oder thermische Aktivierung lässt sich der antimikrobielle Effekt steigern [4]. Auf Grund der oxidierenden und hydrolysierenden Eigenschaften von NaOCl [36] ist es in der Lage, sowohl vitales als auch nekrotisches Gewebe aufzulösen [4; 12; 58;

68]. Dieser Effekt steigt mit einer Erhöhung der Konzentration von NaOCl deutlich an [35]. Auch der organische Teil der Schmierschicht wird abgebaut [68], während die anorganischen Bestandteile unbeeinflusst bleiben [6; 31]. In diesem Zusammenhang kann Natriumhypochlorit auch die organischen Anteile der Zahnhartsubstanz angreifen, so dass die Biegefestigkeit und das Elastizitätsmodul von Dentin reduziert werden. Darüber hinaus kann sein Einsatz die Haftkraft von Bondingsystemen herabsetzen [58].

NaOCl wirkt toxisch auf vitales Gewebe [10; 50]. Somit kann es zu Ödemen, Hämatomen, Ulzerationen, Endothelschäden, Paresen und Nekrosen kommen, wenn es beispielsweise über den Apex hinaus in angrenzende Nachbarstrukturen gepresst wird [10; 68].

2.1.2. *in vivo* Versuche mit Natriumhypochlorit

Bei *in vivo* Untersuchungen wird dem Hypochlorit, wenn es als Spüllösung bei endodontischen Behandlungen verwendet wird, eine signifikant antibakterielle Eigenschaft bescheinigt [22; 60]. SAATCHI [63] berichteten, dass sogar ausgedehnte, zystenähnliche periapikale Läsionen durch eine konservative Therapie mit NaOCl (2,5%ig) als Desinfektionsmittel und Calciumhydroxid als medikamentöse Einlage ausheilen. Somit folgerten sie, dass mit der oben beschriebenen endodontischen Therapie selbst bei starken apikalen Osteolysen in manchen Fällen auf eine chirurgische Behandlung verzichtet werden kann. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch SIQUEIRA *et al.* [73] in ihrer *in vivo* Studie. Sie kontrollierten den Langzeiterfolg einer endodontischen Behandlung bei 93 Patienten anhand von 100 Zähnen, welche eine apikale Parodontitis aufwiesen. Klassischerweise verwendete man während der Aufbereitung der Wurzelkanäle 2,5%iges NaOCl und eine medikamentöse Einlage (u.a. Calciumhydroxid). Bis vier Jahre nach der Behandlung wurden klinische und radiologische Parameter bei Nachsorgeterminen erhoben, um den Heilungsprozess zu dokumentieren. Die behandelten Zähne wurden durch Auswertung der angefertigten Röntgenbilder in drei Gruppen eingeteilt. Dabei stellte eine vollständige radiologische Ausheilung Gruppe 1 dar, eine Verbesserung im Vergleich zum Ausgangsbefund mit noch nicht abgeschlossenem Heilungsprozess definierte man als Gruppe 2 und eine radiologische Verschlechterung des Befundes verglichen mit dem Anfangszustand als Gruppe 3. Die Untersucher legten fest, dass alle Zähne der Gruppen 1 und 2 als erfolgreich behandelt

galten. Es zeigte sich, dass in 95% aller Fälle eine Heilung eintrat und so ein langfristiger Erfolg gewährleistet war.

Allerdings kamen NAIR *et al.* [49] in einer Studie zu dem Schluss, dass bei Verwendung von NaOCl dennoch Bakterien im Wurzelkanal verbleiben. In ihrer Untersuchung wurden 16 Zähne mit apikaler Parodontitis während der Aufbereitung mit 5,25%igem NaOCl desinfiziert. Es stellte sich heraus, dass bei 14 Zähnen auch nach der Behandlung Bakterien im Kanal, insbesondere in schwer erreichbaren Nischen und akzessorischen Kanälen sowie im Kanalsthumus, vorhanden waren. Nach Angaben der Untersucher traten die Mikroorganismen hier v.a. als Biofilm auf.

2.1.3. *in vitro* Versuche mit Natriumhypochlorit

Obwohl Natriumhypochlorit die am häufigsten verwendete endodontische Spüllösung ist [4; 53; 57; 79; 85], gibt es in der Literatur keine einheitlichen Angaben oder Empfehlungen, in welcher Konzentration das Agens verwendet werden soll.

In einer Studie von SIQUEIRA *et al.* [72] wurde die antimikrobielle Wirkung von NaOCl in drei unterschiedlichen Konzentrationen (1%, 2,5%, 5,25%) auf das Bakterium *E. faecalis* untersucht. Hierfür wurden extrahierte humane Zähne artifiziell mit dem Testbakterium infiziert, eine mechanische Aufbereitung und die Desinfektion mit Hypochlorit in den genannten Konzentrationen folgten. Anschließend wurden mittels Papierspitzen Proben aus den Kanälen entnommen, ausplattiert und nach der Inkubationszeit die koloniebildenden Einheiten gezählt. Bei der Auswertung zeigte sich, dass bei allen Konzentrationen ein deutlicher antibakterieller Effekt vorhanden war, wobei es nach Angaben der Untersucher für die drei Lösungen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Wirkung gab. So kamen die Autoren zu der Folgerung, dass häufiges und langes Spülen mit NaOCl für eine gute antibakterielle Wirkung bedeutender ist als die Konzentration der Hypochloritlösung. TIRALI *et al.* [81] kamen in ihrer Untersuchung zu dem Ergebnis, dass das Hypochlorit gegen die Testkeime *E. faecalis*, *S. aureus* und *C. albicans* in einer Konzentration von 5,25% einen höheren antibakteriellen Effekt hatte als in einer Konzentration von 2,5% bzw. 0,5%. Sie stellten fest, dass im Versuch das 5,25%ige NaOCl zur Inaktivierung der Bakterienlösung 20 min und das 2,5%ige NaOCl 30 min benötigte. Bei Verwendung der 0,5%igen Hypochloritlösung hingegen konnte selbst nach 72 h keine Bakterienfreiheit erreicht werden.

OLIVEIRA *et al.* [53] testeten in einem *in vitro* Modell unter anderem die antimikrobielle Wirkung von 1,5%igem und 5,25%igem NaOCl gegen *E. faecalis*. Hierfür wurden 80 humane, einwurzelige Prämolaren für sieben Tage mit dem Bakterium infiziert, die Desinfektion mit den oben genannten Agentien folgte. Vor und nach der Spülung mit Hypochlorit wurden mikrobiologische Proben mit Hilfe von Papierspitzen aus den Wurzelkanälen entnommen, ebenso eine Woche nach der Desinfektion, um einen Langzeiteffekt zu untersuchen. Bei den Ergebnissen kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass das 5,25%ige NaOCl sowohl direkt nach der Spülung als auch bei den Proben, die sieben Tage später genommen wurden, eine signifikante Bakterienreduktion erreichte. Das 1,5%ige Hypochlorit konnte ebenfalls eine effektive Sofortdesinfektion erreichen. Allerdings gab es bei den Proben, die eine Woche nach der Anwendung von 1,5%igem NaOCl genommen wurden, keinen signifikanten Unterschied der Bakterienzahl im Vergleich zu den Infektionskontrollen. Sie folgerten daraus, dass mit steigender Konzentration die antimikrobielle Wirkung von NaOCl größer wird.

Auch in einschlägigen Lehrbüchern der Endodontie finden sich zumeist lediglich Richtwerte, wenn nach der optimalen Konzentration einer NaOCl-Spüllösung gesucht wird. So empfehlen die Autoren HEIDEMANN [34] sowie HÜLSMANN [35] die Verwendung von Natriumhypochlorit in einer Konzentration zwischen 0,5% und 5,25%. BAUMANN [8] raten zur Anwendung von 1-3%igem NaOCl, um die Gewebeverträglichkeit zu erhalten.

Neben der Konzentration haben auch andere Parameter Einfluss auf die Effektivität von NaOCl. In einer Studie von MERCADE *et al.* [43] wurde die Wirksamkeit von 4,2%igem NaOCl in Abhängigkeit vom pH-Wert der Spüllösung gegen den Keim *E. faecalis* untersucht. Hierfür infizierte man 165 einwurzelige humane Zähne für 48h mit dem Bakterium, anschließend unterteilte man sie in drei Untersuchungsgruppen. Die Hypochloritlösungen hatten einen pH-Wert von 12 (=Gruppe 1), 7,5 (=Gruppe 2) und 6,5 (=Gruppe 3). Zur Datengewinnung entnahm man Proben aus den Wurzelkanälen und kultivierte sie in Flüssigmedium, der Trübungsgrad wurde anschließend erhoben. Es zeigte sich, dass die Desinfektionslösung mit dem niedrigsten pH-Wert (6,5) signifikant effektiver war als diejenige mit dem höchsten (12). Die Untersucher folgerten, dass NaOCl in einer leicht sauren Lösung eine stärkere antimikrobielle Wirkung aufweist. Allerdings nimmt laut einer Untersuchung von

CHRISTENSEN *et al.* [13] mit sinkendem pH-Wert einer Hypochloritlösung der gewebsauflösende Effekt signifikant ab.

STOJICIC *et al.* [79] erforschten den Einfluss von Konzentration, Temperatur und Schall- bzw. Ultraschallaktivierung auf die gewebeauflösende Wirkung von NaOCl. In ihrem Versuch lagen die Konzentrationen zwischen 1% und 5,8%, die Testtemperaturen betrugen 37 °C und 45 °C. Geprüft wurde an Rindermuskelgewebe, eine Testgruppe mit sterilem, destilliertem Wasser diente als Referenz. Das Maß des gewebsauflösenden Effekts ermittelte man, in dem die Gewebestücke vor und nach der Behandlung mit den jeweiligen Testsubstanzen gewogen wurden und so der prozentuale Gewebeverlust erhoben wurde. Es stellte sich heraus, dass der Gewichtsverlust der Gewebestücke mit steigender Konzentration von NaOCl kontinuierlich zunahm. Sowohl eine höhere Temperatur als auch die Schall- bzw. Ultraschallaktivierung erhöhten diesen Effekt, wobei die mechanische Aktivierung des NaOCl einen größeren Einfluss hatte. Ähnliches stellten AL-JADAA *et al.* [4] fest. Sie testeten, ob passive Ultraschallaktivierung den gewebeauflösenden Effekt von 2,5%igem Hypochlorit verbessern kann. In ihrem Modell erstellten sie hierfür Prüfkörper aus Epoxidkunststoff, welche mit durchsichtigen Wurzelkanälen versehen wurden. Das Kanalsystem versah man mittig und im apikalen Bereich mit 0,2 mm tiefen Querbohrungen, um akzessorische Seitenkanäle zu simulieren. Diese wurden anschließend mit nekrotischem Rinderpulpagewebe gefüllt. Die Desinfektion erfolgte auf zwei Arten: Eine Untersuchungsgruppe wurde mit 2,5%igem NaOCl in Kombination mit passiver Ultraschallaktivierung insgesamt fünf Minuten lang behandelt, die Kontrollgruppe desinfizierte man ebenfalls mit der 2,5%igen Hypochloritlösung für die gleiche Zeit, allerdings ohne jegliche Aktivierung des Agens. Um den Einfluss der Temperatur auf die Effektivität der Spüllösung auszuschalten, wurde das NaOCl in der Kontrollgruppe auf die Gradzahl erwärmt, die bei der Ultraschallaktivierung durch Reibung erreicht wurde. Somit waren sowohl die Konzentration, als auch die Einwirkzeit und die Temperatur der Spüllösungen in beiden Gruppen gleich. Bei der Auswertung stellten die Untersucher fest, dass der gewebsauflösende Effekt in der Gruppe mit Ultraschallbehandlung signifikant höher war als bei der Kontrollgruppe. Sie folgerten, dass nicht die Temperaturerhöhung durch die passive Ultraschallaktivierung allein für die höhere Effektivität verantwortlich ist. GREGORIO *et al.* [31] beschrieben ebenfalls die Ultraschallaktivierung von NaOCl als effektiv. Sie verglichen die Wirkung verschiedener Aktivierungssysteme für Spüllösungen, darunter

Schallaktivierung, passive Ultraschallaktivierung und ein apikales Unterdruckverfahren, wobei eine Behandlung mit Ultraschall in ihrem Versuchsaufbau die höchste Eindringtiefe des Agens in die artifiziellen Seitenkanäle zeigte. HARRISON *et al.* [32] infizierten in einer Untersuchung 130 Wurzeln von intakten menschlichen Zähnen vier Wochen lang mit *E. faecalis*. Mit Ausnahme der Kontrollgruppe, bei der eine erfolgreiche Infektion mit Licht- bzw. Elektronenmikroskopie überprüft wurde, führten die Untersucher bei allen Wurzeln eine chemomechanische Aufbereitung mit dem ProTaper-System (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Schweiz) sowie 15%igem EDTA und 1%igem NaOCl als Spülungen durch. Anschließend wurden die Wurzelstücke in drei Gruppen unterteilt: Bei Gruppe 1 folgte nach der oben beschriebenen Prozedur keine weitere Behandlung mehr, die Wurzeln in Gruppe 2 wurde eine Minute lang mit ultraschallaktiviertem, 1%igem NaOCl desinfiziert und in Gruppe 3 behandelte man die Kanäle mit einer einwöchigen Calciumhydroxid-Einlage. Die Untersucher stellten fest, dass Ultraschallaktivierung von 1%igem NaOCl für eine Minute im Versuch den gleichen antibakteriellen Effekt wie eine einwöchige medikamentöse Wurzelkanaleinlage mit Calciumhydroxid hatte. Des Weiteren wurde beobachtet, dass im Vergleich zur konventionellen Handaufbereitung eine Ultraschallaktivierung zu einer verbesserten Wirkung des Agens in den Dentintubuli führte.

Das allgemeine Penetrationsvermögen von NaOCl in die Dentintubuli stellten ZOU *et al.* [85] in einer Studie in den Fokus. Hier sollte ermittelt werden, welchen Einfluss Konzentration, Einwirkzeit und Temperatur auf die Tiefenwirkung von Hypochlorit haben. Dafür wurden 30 extrahierte, einwurzelige, bleibende, humane Frontzähne mit dem ProTaper-System (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Schweiz) aufbereitet. Anschließend wurden der koronare Anteil sowie das apikale Drittel entfernt, eine Spaltung der Zähne folgte. Schließlich entstanden 4 mm lange Blöcke, die dann über Nacht mit einer violetten Lösung eingefärbt wurden. Die Behandlung mit NaOCl erfolgte in den Konzentrationen 1%, 2%, 4% und 6% für 2 min, 5 min und 20 min bei 20 °C, 37 °C und 45 °C. Die Penetrationstiefe des Agens ermittelte man anhand des Grades der Entfärbung der Proben mit Hilfe von lichtmikroskopischen Bildern, welche durch ein Computerprogramm (Nikon digital sight DS-L2) ausgewertet wurden. Bei der Testauswertung wurde festgehalten, dass 1%iges NaOCl für 2 min bei 20 °C die geringste Eindringtiefe in die Dentintubuli aufwies. Die stärkste Penetration wurde mit 6%igem NaOCl für 20 min bei 45 °C erreicht. Es zeigte sich, dass die Temperatur nur wenig Einfluss auf die Tiefenwirkung hatte. Mit steigender Konzentration

des Agens konnte eine stärkere Penetration erreicht werden, allerdings waren die Unterschiede gering. So konnte die 1%ige Lösung je nach Untersuchungsgruppe 50-80% des Effektes des 6%igen NaOCl erreichen. Die Autoren schlussfolgerten insgesamt, dass Temperatur, Wirkdauer und Konzentration das Penetrationsvermögen von Natriumhypochlorit in die Dentintubuli beeinflussen.

2.1.4. *in vivo* und *in vitro* Versuche zum Vergleich von Natriumhypochlorit mit anderen Desinfektionsmitteln

In zahlreichen Studien wird die Wirkung des Hypochlorits mit der anderer Spüllösungen bzw. Desinfektionsmethoden verglichen. Besonders häufig wurde dabei die Effektivität von Natriumhypochlorit im Vergleich mit Chlorhexidin (CHX) untersucht, da diese beiden Agentien die meist angewandten Spüllösungen in der Endodontie sind [23]. DUMANI *et al.* [18] testeten die Effektivität von CHX und NaOCl anhand von Resilon-Prüfkörpern, welche mit *E. faecalis* bzw. *C. albicans* infiziert waren. Hierfür desinfizierten sie die Kunststoffkörper mit 1%igem und 5%igem NaOCl sowie 2%igem Chlorhexidin für 1 min und 5 min, eine Überführung der Testblöcke in Medium folgte. Zur Datenerhebung ermittelte man das Bakterienwachstum nach siebentätiger Inkubation bei 37 °C. Es zeigte sich, dass mit NaOCl für jede Konzentration und jede Einwirkzeit eine effektive Bakterienverringerung sowohl für den *E. faecalis* als auch für den *C. albicans* erreicht werden konnte. Dies galt für das CHX nicht. Hier fand man für beide Testkeime unzureichend desinfizierte Proben bei einer Einwirkzeit von einer Minute. Ließ man das Chlorhexidin für 5 min einwirken, erhielt man laut Aussage der Untersucher effiziente Desinfektionen. Im Gegensatz dazu zeigten VIANNA und GOMES [83] in ihrer *in vitro* Untersuchung, dass CHX bezüglich der Bakterienelimination effektiver war als Hypochlorit. Ziel ihrer Studie war es, die Wirkung einer Spüllösung, die aus einer Kombination von NaOCl und CHX bestand, gegen den Keim *E. faecalis* zu untersuchen. Getestet wurden 2%iges CHX-Gel und -Flüssigkeit, 1%, 2,5% und 5,25%iges NaOCl sowie die Kombination der beiden Substanzen in allen oben genannten Konzentrationen. Mit Hilfe zweier Testverfahren (Agardiffusionstest und Medium-Verdünnungs-Reihen) konnte gezeigt werden, dass die alleinige Anwendung von CHX den größten antibakteriellen Effekt hatte. Wurde das Hypochlorit ohne das CHX verwendet, kam es zum geringsten antimikrobiellen Effekt im Test. Die Kombination der beiden Desinfektionsmittel erreichte den Grad der Bakterienreduktion von alleine angewandtem CHX nicht. Auch ONCAG *et al.* [54]

beschrieben in ihrer *in vitro* Studie 2%iges CHX als deutlich wirksamer gegen das Testbakterium *E. faecalis* als 5,25%iges Natriumhypochlorit. ERCAN *et al.* [22] wiederum kamen in einer *in vivo* Studie mit 20 Patienten zu dem Ergebnis, dass beide Agentien ähnlich gut antimikrobiell sind. Auch sie erforschten die desinfizierende Wirkung von 2%igem CHX und 5,25%igem NaOCl. Dazu wurden 30 Wurzelkanäle von Inzisivi und Prämolaren, welche eine nekrotische Pulpa und periapikale Läsionen aufwiesen, als Datengrundlage herangezogen. Vor und nach dem Einsatz der Desinfektionsmittel wurden mittels sterilen Papierspitzen mikrobielle Proben aus den Kanälen entnommen und auf Trypticase-Soy-Agarplatten für fünf bis sieben Tage inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Kolonien ausgezählt. Es konnte gezeigt werden, dass beide Spüllösungen einen signifikanten antibakteriellen Effekt haben. Zu ähnlichen Resultaten kamen ROCAS und SIQUEIRA [60]. Sie leiteten ebenfalls eine *in vivo* Untersuchung mit dem Ziel, den antimikrobiellen Effekt von 2,5%igem NaOCl mit dem von 0,12%igem CHX zu vergleichen. Beide wurden als Spüllösungen bei der Behandlung von Zähnen mit einer Wurzel und einem Wurzelkanal bei vorhandener asymptomatischer apikaler Parodontitis eingesetzt. Vor und nach der Anwendung der Desinfektionsmittel wurde das Keimspektrum in den Kanälen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestimmt. Es konnte sowohl für NaOCl als auch für CHX eine signifikante Bakterienreduktion ermittelt werden, wobei es nach Angaben der Untersucher keine signifikanten Unterschiede bei der Wirksamkeit der beiden Testsubstanzen gab. Die kontroversen Ergebnisse dieser und zahlreicher anderer Untersuchungen können laut ESTRELA *et al.* [23] möglicherweise durch ihre Unterschiede hinsichtlich Studiendesign, Art der Durchführung, Konzentrationen der Spüllösungen, Einwirkzeiten und Datenerhebung erklärt werden.

GIARDINO *et al.* [28] verglichen in einer Studie von 2007 das Natriumhypochlorit (5,25%) mit BioPure MTAD (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN; die Abkürzung MTAD ist zusammengesetzt aus den Initialen des Entwicklers (MT), das T weist des Weiteren auf das Tetracyclin im Präparat hin, A steht für das englische Wort für Säure (acid) und D für das enthaltene Detergens), und Tetraclean (Ogna Laboratori Farmaceutici, Milano, Italien) anhand des Testkeims *E. faecalis*. Im Studienaufbau erzeugte man einen Bakterienbiofilm auf Cellulose-Nitrat-Membranen. Diese Membranen wurden dann mit den jeweiligen Agentien desinfiziert, eine Inkubation der Proben und die anschließende Ermittlung der koloniebildenden Einheiten folgten. Im Ergebnisabschnitt der Untersuchung beschrieben die

Autoren NaOCl als das effektivste Agens im Test. Als die gleichen Desinfektionslösungen jedoch zwei Jahre später von GIARDINO *et al.* [27] im Agarplattendiffusionstest miteinander verglichen wurden, waren BioPure MTAD und Tetraclean bei der Eliminierung von *E. faecalis* effektiver als das 5,25%ige NaOCl. BioPure MTAD und Tetraclean sind endodontische Spüllösungen, die beide aus einem Tensid, einer Säure und dem Breitbandantibiotikum Doxycyclin bestehen. Das Antibiotikum ist allerdings in Tetraclean geringer konzentriert als in BioPure MTAD.

Neuerdings wird zunehmend die antibakterielle Photodynamische Therapie (aPDT) als eine neue Möglichkeit der Wurzelkanal desinfektion wissenschaftlich untersucht. Das Prinzip der aPDT beruht auf der photochemischen Aktivierung eines nicht toxischen Photosensitizers (z.B. Toluidinblau) mit Hilfe von Licht einer bestimmten Wellenlänge unter der Anwesenheit von Sauerstoff, wobei reaktive Sauerstoffspezies und Radikale entstehen. Diese sind in der Lage, Bakterienzellen durch Schädigung von Membranlipiden, Zellproteinen und Nukleinsäuren abzutöten [39]. SOUZA *et al.* [78] testeten in einer *in vitro* Studie die Wirkung der aPDT und stellten sie in Korrelation zu Natriumhypochlorit. Sie infizierten hierfür 70 humane Zähne eine Woche lang mit *E. faecalis*. Anschließend wurden die Kanäle aufbereitet und mit NaOCl oder Kochsalzlösung (NaCl) gespült. Die Desinfektion mittels photodynamischer Therapie folgte, wobei zwei unterschiedliche Farbakтивatoren angewandt wurden (Methylenblau und Toluidinblau). Im Ergebnisteil beschrieben die Untersucher das NaOCl als signifikant effektiver als das NaCl, wobei die Unterschiede auch nach der Anwendung der photodynamischen Therapie bestehen blieben. Die aPDT konnte also keine Verbesserung der Desinfektion erreichen. Dabei gab es bei den beiden Photoaktivatoren keine Unterschiede bezüglich der Bakterienelimination. BONSOR *et al.* [10] jedoch konnten in einer *in vivo* Studie andere Ergebnisse vorweisen. Sie kamen zu dem Schluss, dass die aPDT in Kombination mit 20%iger Zitronensäure auch ohne NaOCl-Spülung die Wurzelkanäle adäquat desinfizieren kann. Sie beschrieben die photodynamische Therapie als ebenso effektiv wie eine konventionelle chemomechanische Aufbereitung mit Natriumhypochlorit.

2.2. *Enterococcus faecalis*

2.2.1. Allgemeines zum Bakterium *Enterococcus faecalis*

Enterokokken sind grampositive, paarig oder als kurze Ketten angeordnete, kugelförmige Bakterien, die lange Zeit zu den Streptokokken der Serogruppe D gezählt wurden; nach dem neuesten Klassifikationsschema werden sie aber der Familie der Enterococcaceae zugerechnet [51]. Als die wichtigsten humanpathogenen Spezies gelten der häufig vorkommende *Enterococcus faecalis* und der etwas seltenere *Enterococcus faecium* [51], die zur physiologischen Darmflora von Menschen und Tieren gehören [37; 47; 82]. Erstmals beschrieben wurde der Name „entérocoque“, der den intestinalen Ursprung dieser grampositiven Diplokokken hervorhebt, bereits im Jahre 1899 von THIERCELIN in seinem Artikel „Sur un *diplocoque* saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène“. Der *E. faecalis* besitzt einen fakultativ anaeroben Stoffwechsel, aber keine Katalase-Aktivität und kann auch bei extremen, wechselnden Bedingungen überleben [37]; er ist hitzestabil bei bis zu 60 °C für 30 min und wachstumsfähig in 6,5%iger NaCl-Lösung oder bei einem pH von 9,6, wie SHERMAN bereits 1938 in seinem Review-Artikel „The Enterococci and related Streptococci“ erklärte [47; 69].

Im Rahmen nosokomialer Infektionen zählt der *Enterococcus faecalis* zu den drei häufigsten ursächlichen Keimen [5; 41; 47]. Endokarditis, Atemwegs- und Harnwegsinfekte sowie Infekte des zentralen Nervensystems sind die am häufigsten auftretenden Krankheitsfälle [82]. Insbesondere der vermehrte Einsatz von Antibiotika mit fehlender Wirksamkeit gegen Enterokokken, der sogenannten „Enterokokkenlücke“, begünstigt dieses Phänomen. Immunsupprimierte, schwer erkrankte oder neutropenische Patienten sind besonders empfänglich für eine Infektion mit opportunistischen Erregern [51]. Das stetige Aufkommen neuer multiresistenter Enterokokken-Stämme, wie z.B. Aminopenicillin-, Gentamicin- und Vancomycin-resistenter Enterokokken [82], stellt die Wissenschaft in der Entwicklung neuer, wirksamer antimikrobieller Strategien vor eine enorme Herausforderung und bereitet den Ärzten bei der Behandlung infizierter Patienten Schwierigkeiten [5; 37; 41].

In der Zahnheilkunde tritt der *Enterococcus faecalis* ebenfalls im Zusammenhang infektiöser Geschehen auf: Er wird vor allem in der Endodontie mit fehlgeschlagenen Wurzelbehandlungen und persistierenden Infektionen der Periapikalregion in Verbindung gebracht [1; 25; 37; 84]. Problematisch ist seine Unempfindlichkeit gegenüber vielen, in

endodontischen Behandlungen gebräuchlichen, antibakteriellen Spüllösungen und Medikamenten [16; 37; 59; 71]. Es ist keine Seltenheit, dass er auch in abgefüllten Wurzelkanälen noch nachgewiesen wird [16; 24; 25]. Gelegentlich kommt er in Mischinfektionen akuter odontogener Abszesse vor [77] und auch im Speichel und in Plaque wird der *Enterococcus faecalis* gefunden [3; 16; 84].

2.2.2. *in vivo* Studien zum *Enterococcus faecalis* in der Endodontie

ZHU *et al.* [84] stellten mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) fest, dass die meisten revisionsbedürftigen, wurzelbehandelten Zähne mit bestehender Parodontitis apicalis mit dem *Enterococcus faecalis* besiedelt waren. Teilweise war der Keim auch im Speichel der Patienten nachzuweisen. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Studie von GOMES *et al.* [29], bei der ebenfalls Proben aus zuvor wurzelgefüllten Zähnen mit röntgenologischer apikaler Aufhellung isoliert und anhand PCR untersucht wurden: Bei der mikrobiologischen Auswertung wurde auch hier am häufigsten der *Enterococcus faecalis* in den Proben identifiziert, gefolgt von *Peptostreptococcus micros*. Bei den anderen Mikroorganismen handelte es sich u.a. um *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* und *Prevotella intermedia*. Auch DAHLEN *et al.* [16] wiesen in allen Fällen von 29 wurzelgefüllten Zähnen mit persistierender apikaler Parodontitis *Enterococcus spp.* mit der PCR nach, die zusätzlich einer Antibiotika-Resistenzbestimmung unterzogen wurden. Es handelte es sich in 26 Fällen um den *Enterococcus faecalis* und in 3 Fällen um den *Enterococcus faecium*. Alle Keime konnten hierbei mit Vancomycin und Erythromycin erfolgreich behandelt werden, die meisten hielten auch dem Tetracyclin-HCl Präparat nicht stand. Eine Resistenz bestand hauptsächlich gegenüber Clindamycin und Metronidazol. In einer Untersuchung von ROCAS *et al.* [61] wurde festgestellt, dass der *Enterococcus faecalis* bei Zähnen mit chronischer oder persistierender Infektion öfter nachgewiesen wurde, als bei Zähnen mit akuter Entzündung. Ein signifikanter Zusammenhang des *Enterococcus faecalis* bestehe vor allem mit fehlgeschlagenen Wurzelbehandlungen. Des Weiteren komme Selbiger häufiger bei asymptomatischer apikaler Parodontitis vor als bei symptomatischer. Eine Untersuchung von OZBEK *et al.* [56] bestätigt diese Ergebnisse: auch hier besteht eine größere Assoziation des Mikroorganismus mit fehlgeschlagenen Wurzelbehandlungen. In einer Studie von GOMES *et al.* [30] wurden Proben aus bisher unbehandelten und aus revisionsbedürftigen Wurzelkanälen mit apikaler Parodontitis entnommen. Die mikrobiologische Diagnostik

erfolgte einerseits mit Kulturen und andererseits mittels PCR. Dabei war der Nachweis des *E. faecalis* mittels PCR empfindlicher als der Kulturnachweis. Mit ihr konnte der Mikroorganismus weitaus sensitiver detektiert werden, einen Hinweis darauf, wie stark ein Wurzelkanal mit dem Bakterium kontaminiert war, konnte sie jedoch nicht geben. Im Gegensatz zu der Untersuchung von ROCAS *et al.* [61], wurden durch die PCR in den erstmals wurzelbehandelten Zähnen genauso oft Enterokokken nachgewiesen, wie in den revidierten Wurzelkanälen. Die Kulturen hingegen zeigten des Öfteren kein Wachstum, wo die PCR einen DNA-Nachweis des *E. faecalis* lieferte. Hierbei muss allerdings bedacht werden, dass bei der PCR auch tote Bakterien angezeigt werden. Mit Hilfe des Kulturnachweises sind im Gegensatz dazu nur lebende Mikroorganismen zu detektieren.

2.2.3. *in vitro* Studien zum *Enterococcus faecalis* in der Endodontie

Aufgrund seines anspruchslosen, umweltresistenten Wachstums [37; 47; 69] und seiner großen Bedeutung im Hinblick auf fehlgeschlagene Wurzelbehandlungen [29; 84] wird der *Enterococcus faecalis* sehr häufig bei *in vitro* Untersuchungen benutzt, um die Wirksamkeit von Desinfektionsagentia zu testen. So wurde er auch von ABDULLAH *et al.* [1] in ihrer Studie eingesetzt: Anhand drei unterschiedlicher Kulturaufbereitungen des *Enterococcus faecalis* - nämlich einer Suspension, eines Biofilms und eines Pellets - untersuchten sie die Wirksamkeit verschiedener Desinfektionsagenzien, u.a. von Calciumhydroxid (pH=12,3), 0,2%igem CHX, 17%igem EDTA und 3%igem NaOCl, für unterschiedliche Einwirkzeiten. NaOCl war hierbei am effektivsten und tötete alle Mikroorganismen binnen 2 min irreversibel ab. CHX und Ca(OH)₂ konnten keine 100%ige Desinfektion gewährleisten, EDTA lieferte insgesamt die unzureichendsten Ergebnisse. Es wurde gezeigt, dass sich *in vitro* die Inaktivierung des *Enterococcus faecalis* in einem Biofilm schwieriger gestaltet als in einer Suspension, falls das Desinfektionsagens keine gewebeauflösenden Eigenschaften besitzt. EVANS *et al.* [24] stellten fest, dass der *Enterococcus faecalis* trotz der Anwendung von Ca(OH)₂ überleben kann, wenn der erreichte pH-Wert im Wurzeldentin $\leq 11,1$ ist. Bei höherem pH-Wert sinkt seine Überlebenswahrscheinlichkeit. Die Ergebnisse von ABDULLAH *et al.* [1] decken sich weitgehend mit denen von DUNAVANT *et al.* [19], die ebenfalls unterschiedliche Agenzien in ihrer Wirksamkeit gegenüber einem *E. faecalis* Biofilm testeten: Auch sie fanden heraus, dass CHX in 2%iger Lösung weniger effektiv desinfiziert, als NaOCl in 1%iger und 6%iger Lösung. Auch die relativ neu entwickelte Spüllösung BioPure MTAD

(Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN, USA), die aus einer Mischung aus Zitronensäure, Doxycyclin und einem Detergenten besteht, konnte keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern: Nur 16% der Bakterien konnten irreversibel inaktiviert werden. 17%iges EDTA schnitt hinsichtlich der Desinfektion wieder insuffizient ab. Es eignet sich jedoch sehr gut zur Schmierschichtentfernung: Durch die Eröffnung der Dentintubuli wird für andere Desinfektionsagenzien ein Zugang zu den Mikroorganismen geschaffen [25]. NEWBERRY *et al.* [52] verwendeten MTAD als finale Spüllösung von Wurzelkanälen extrahierter Zähne. Die Kanäle wurden zunächst aufbereitet und mit 1,3%igem NaOCl und 17%igem EDTA gespült. Anschließend wurden sie in 8 Gruppen unterteilt und mit je einem von 8 unterschiedlichen *E. faecalis* Stämmen infiziert. Es erfolgte eine letzte Spülung mit NaOCl, bevor MTAD für 5 min in die Kanäle gegeben wurde. Eine effektive Desinfektion durch die Kombination von NaOCl und MTAD wurde in 7 von 8 Gruppen erreicht. Lediglich bei dem *E. faecalis* Stamm ATCC 19433 konnte noch ein Wachstum nach der Behandlung beobachtet werden.

Um eine suffiziente Desinfektion des *Enterococcus faecalis* gewährleisten zu können, wird heutzutage von einigen Autoren empfohlen, mehrere Spüllösungen in der Wurzelbehandlung zu verwenden, da oftmals eine einzige Desinfektionsmethode nicht effektiv genug ist [52]. In diesem Zusammenhang hat sich vor allem die kombinierte Anwendung von NaOCl, EDTA, CHX und Ca(OH)₂ bewährt [65]. Um aseptische Bedingungen zu schaffen, ist das Anlegen eines Kofferdams unerlässlich [25].

2.3. Natriumthiosulfat

Natriumthiosulfat als Pentahydrat (Na₂S₂O₃) hat ein Molekulargewicht von 248,2 und weist in Wasser einen neutralen pH-Wert auf. Während es vom Verdauungstrakt kaum adsorbiert wird, verteilt es sich nach intravenöser Gabe in der extrazellulären Flüssigkeit und wird renal unverändert ausgeschieden [14; 48]. Die Herstellung erfolgt durch Kochen von Natriumsulfit (Na₂SO₃) mit Schwefel (vgl. Abb. 2).

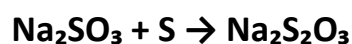


Abbildung 2: Synthese von Natriumthiosulfat aus Natriumsulfit und Schwefel [40]

Natriumthiosulfat findet in den verschiedensten Bereichen Anwendung. So wird es beispielsweise als Fixiersalz in der Fotografie benutzt, da es Silberhalogenide unter Komplexbildung lösen kann [40]. In der Medizin findet es u.a. Verwendung als Medikament bei kalzifischer Nephrolithiasis, tumoröser Kalzinose und neuerdings auch bei Kalziphyllaxie, da es in der Lage ist, Kalzium aufzulösen. Hierbei entsteht ein sehr leicht lösliches Salz, das durch die Dialyse entfernt werden kann. Auch bei Cyanidvergiftungen kommt Natriumthiosulfat als Antidot zum Einsatz. Es selbst wirkt kaum toxisch [48].

2.4. *Bacillus subtilis*

Für den experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit wurden als Proben Zahnwurzeln frisch geschlachteter Rinder verwendet. In diesem Kapitel wird deshalb auf den aerob wachsenden Sporenbildner *Bacillus subtilis* eingegangen, da die Rinderzähne natürlicherweise, bedingt durch die Nahrung der Tiere, mit diesem Keim besiedelt waren.

Der *Bacillus subtilis*, auch gemeiner Heubazillus genannt, ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges, begeißeltes Bakterium und gehört wie alle Bakterien der Gattung *Bacillus* taxonomisch zu den Eubakterien (Bacteria). Er ist ein aerob wachsender Endosporenbildner, der ubiquitär verbreitet ist. So kann er in Wasser, Luft und Boden (besonders Komposterde) nachgewiesen werden und ist im Heuaufguss leicht anzureichern. Bedingt durch seinen natürlichen Lebensraum ist der Mikroorganismus wechselnden Umwelteinflüssen wie etwa Temperaturschwankungen und unbeständiger Luftfeuchtigkeit relativ ungeschützt ausgeliefert [9]. Er hat daher im Laufe der Evolution eine Reihe von Strategien entwickelt, die sein Überleben auch unter widrigsten Umständen sichern. So ist er zur Ausbildung von Sporen befähigt, die gegen Austrocknung, Bestrahlung und Hitze resistent sind [17; 70]. Daher kann man mit gängigen Desinfektionsmethoden wie etwa hochprozentigem Ethanol keine vollständige Eliminierung dieses Mikroorganismus erreichen [20]. Auch klassische Sterilisationsverfahren wie etwa die Dampfdrucksterilisation bei 121 °C bzw. 134 °C sind nicht in der Lage, die Sporen zu inaktivieren [45]. Wegen dieser Eigenschaft wird *Bacillus subtilis* heute als Indikator bei der Testung von Sterilisationsprozessen und Desinfektionsmethoden in Pharmazie, Medizin und Lebensmittelindustrie verwendet [2; 51; 62; 70].

Des Weiteren findet das Bakterium als Pharmakon in der Humanmedizin Anwendung. So sind Medikamente wie etwa Utilin®, Utilin N®, Bactisubtil® und andere zur Behandlung von chronischen Dermatosen bzw. von Durchfall, Enteritis, Enterocolitis oder von intestinalen Störungen chemo- oder strahlentherapierter Krebspatienten in der Roten Liste sowie in zahlreichen Studien beschrieben [9; 38; 75; 76]. Seine antimikrobielle Wirkung gegen einige Fäulniserreger, darunter auch *Candida albicans*, wird medikamentös genutzt [80]. Auch in der Landwirtschaft dient das Bakterium als natürliches Fungizid beim Anbau von Baumwolle, Gemüse, Erdnüssen und Sojabohnen [9].

Für molekularbiologische und genetische Untersuchungen ist der Mikroorganismus von besonderem Interesse aufgrund seiner phylogenetischen Nähe zu Pathogenen wie Staphylokokken, Listerien, Mykobakterien und Mykoplasmen sowie wegen der beschriebenen Endosporenbildung. Er ist daher eines der am besten erforschten grampositiven Bakterien überhaupt [9; 17]. Ferner spielt *Bacillus subtilis* wegen seiner Fähigkeit, extrazelluläre Enzyme zu sezernieren, bei der industriellen Herstellung von Waschmittelenzymen sowie bei der Synthese von Riboflavin (Vitamin B 12) eine Rolle [9].

3. Fragestellung

Die Zielsetzung dieser Arbeit liegt darin, ein bereits bestehendes *in vitro* Modell zur Testung endodontischer Desinfektionsmethoden anhand artifiziell infizierter, boviner Wurzelkanäle weiterzuentwickeln. In Anlehnung an die im Literaturverzeichnis beschriebenen Punkte sollen in dieser Arbeit folgende Aufgaben abgehandelt werden:

1. Es soll ein vollständig autoklavierbarer Bohrständer entwickelt, angefertigt und verwendet werden, der Präzisionsbohrungen ins Dentin im Mikrometerbereich erlaubt.
2. Durch Modifizierungen des Bohrvorgangs soll versucht werden, ein Tiefenprofil der mit Mikroorganismen besiedelten Dentintubuli darzustellen. Es soll untersucht werden, wie weit die Bakterien in die Dentintubuli vordringen konnten und ob es mit der Desinfektionsmethode gelang, auch Mikroorganismen in tieferen Dentinschichten irreversibel zu eliminieren.
3. Die antibakterielle Wirkung von Natriumhypochlorit soll in unterschiedlichen Konzentrationen und abgestoppten Einwirkzeiten anhand dieses verbesserten Modells untersucht werden.
4. Durch die Verwendung von Natriumthiosulfat als Stopplösung bei der Desinfektion soll ein unkontrolliertes Nachwirken des Natriumhypochlorits vermieden werden.

4. Material und Methode

4.1. Eingesetzter Mikroorganismus

Die für den Test benötigten Bakterien wurden vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg bezogen.

Für die Versuche wurde verwendet: *Enterococcus faecalis* GC ATCC 29212

4.2. Testmaterialien

Das verwendete Testmaterial, NaOCl, wurde als wässrige Lösung in den Konzentrationen 0,5%, 1,0% und 3,0% von der Apotheke des Klinikums der Universität Regensburg bezogen. Die Lagerung erfolgte in verschlossenen, braunen Glasfläschchen im Kühlschrank¹ bei 7,5 °C. Das verwendete Reduktionsmittel Natriumthiosulfat wurde als 22%ige wässrige Lösung selbst hergestellt. Dafür wurden 345,5 g Natriumthiosulfat-Pentahydrat in 1 l destilliertem Wasser gelöst und anschliessend steril filtriert. Gelagert wurde es in einem verschlossenen 50 ml Falcon-Röhrchen im Kühlschrank bei 7,5 °C. Die im Experiment benötigten Mengen an Testsubstanzen wurden stets mit sterilen, automatischen Pipetten entnommen.

4.3. Nährmedien

Zur Herstellung einer für Enterokokken geeigneten Nährbouillon wurden eine Einwaage von 30 g Typticase-Soy-Broth² und 3 g Hefeextrakt³ in 1 l 18 Ω-Millipore Wasser aus dem Millipore-Gerät⁴ gelöst. Die Flüssigkeit wurde anschließend für 20 min bei 121°C und einem Druck von 3 bar im Autoklaven⁵ dampfsterilisiert.

Zur Koloniezahlbestimmung am Versuchsende wurden die Proben auf 94 mm Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden (= Enterokokkenplatten) ausgestrichen, welche vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg hergestellt wurden.

¹ FKS 5002, Liebherr (Bulle, Schweiz)

² Becton & Dickinson (Sparks, USA)

³ Bacto Yeast Extract, Becton & Dickinson (Sparks, USA)

⁴ MilliQUPplus, Millipore (Molsheim, Frankreich)

⁵ Fedegari Autoclavi (Albuzzano, Italien)

Die Platten wurden bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank⁶ bei 7,5 °C aufbewahrt. Die Lagerdauer hat einen Zeitraum von 3 Wochen nie überschritten.

4.4. Inkubation der *Enterococcus faecalis* Arbeitskulturer

Die Temperatur für die Inkubation der *E. faecalis* Arbeitskulturer lag bei 37 °C, die CO₂-Konzentration, der Luftdruck und die Luftfeuchtigkeit in der Inkubationskammer⁷ wurden durch die Umgebungsatmosphäre bestimmt. Bei geschlossenem Inkubator herrschte in der Inkubationskammer Dunkelheit.

4.5. Sicherheitsvorkehrungen

Die Durchführung der Versuche erfolgte unter sterilen Laborbedingungen unter einer sterilen Werkbank⁸. Lediglich das Spalten der Zahnstücke und das Ausplattieren der Bohrspan suspensionen auf den Nährböden erfolgten aus technischen Gründen außerhalb der Werkbank. Der Arbeitstisch wurde dafür vor und nach den Arbeiten gründlich gereinigt und desinfiziert. Zur Desinfektion von nicht sterilisierbaren Arbeitsgeräten und -flächen wurde Ethanol in einer 70%igen Lösung verwendet. Diese wurde im Labor durch Verdünnung von Ethanol absolut⁹ mit voll entsalztem Wasser aus dem Laborwasserhahn selbst hergestellt. Bei allen Laborarbeiten wurden vom Doktoranden Schutzbrille, Schutzkittel, sterile Handschuhe¹⁰ und Mundschutz¹¹ getragen. Zur Händedesinfektion vor, während und nach den verschiedenen Arbeiten wurde Sterillium¹² verwendet.

4.6. Herstellung einer Gefrierkulturer

Zur Herstellung einer frischen *E. faecalis*¹³ Gefrierkulturer wurde ein *E. faecalis* Gefriercryo aufgetaut, das in einem Gefrierschrank¹⁴ bei -80 °C vorrätig gelagert war. Je 400 µl der

⁶ FKS 5002, Liebherr (Bulle, Schweiz)

⁷ B5060, Heraeus (Hanau)

⁸ HF 48, GelaireFlow Laboratories (Opera, Italien)

⁹ Chemikalienausgabe, Universität Regensburg

¹⁰ Sempermed, Semperit Technische Produkte (Wien, Österreich)

¹¹ Sentinex Lite EI, Lohmann & Rauscher (Neuwied)

¹² Sterillium, Bode Chemie (Hamburg)

¹³ Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg

¹⁴ Forma -86 Freezer, Thermo Electron Corp. (Marietta, USA)

Suspension wurden zu zwei 40 ml Portionen sterilem Nährmedium gegeben, welches zuvor in 50 ml Falcon-Röhrchen¹⁵ pipettiert worden war. Anschließend wurden die Lösungen für 24 h bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Falcons in der Zentrifuge¹⁶ für 7 min bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert, der flüssige Überstand konnte verworfen werden. Zu den am Boden des Röhrchens verbliebenen Pellets kam je 5 ml frisches, steriles Nährmedium und mit dem Vortex¹⁷ wurden diese wieder in Lösung gebracht. Dazu wurde nun 5 ml 87%iges Glycerin¹⁸ steril pipettiert und die Lösung mit dem Vortex erneut aufgeschüttelt. Unter der sterilen Werkbank wurden je 250 µl der Suspension in Gefrier-Cryos¹⁹ pipettiert, die dann gut verschlossen bei -80 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert wurden. Am darauffolgenden Tag wurden je 100 µl einer wieder aufgetauten Probe der neu hergestellten Kulturen auf einer selektiven Enterokokken-Platte sowie auf einer universellen Caso-Platte²⁰ ausgestrichen und für 24 h im Inkubator bebrütet. Dies diente dazu, um einerseits das Wachstum der neuen *E. faecalis* Kulturen auf den im Versuch verwendeten Platten zu überprüfen und um andererseits eine Fremdkontamination mit anderen Organismen ausschließen zu können.

4.7. Vorbereitung einer Arbeitskult

Um eine Arbeitskult vorzubereiten, wurde ein bei -80 °C gelagertes *E. faecalis* Gefriercryo aufgetaut. 100 µl wurden daraus entnommen und in einen mit Glasperlen gefüllten Erlenmayer-Kolben²¹ gegeben, der bereits 25 ml steriles Trypticase-Soy-Broth Medium enthielt. Dieser Kolben wurde bei 37 °C für 24 h inkubiert. Vor der Verwendung der Suspension erfolgte das Vermessen bei 600 nm Wellenlänge gegen ein steriles Medium. Dazu wurden jeweils 1 ml der beiden Flüssigkeiten in Küvetten²² gegeben und diese mit Parafilm²³ verschlossen, um ein Auslaufen der Küvetten beim Messvorgang zu verhindern.

¹⁵ Cellstar Greiner bio-one (Poitiers, Frankreich)

¹⁶ Universal 320, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

¹⁷ REAX2000, Heidolph (Schwabach)

¹⁸ Artikelnummer 1.04094, Merck (Darmstadt)

¹⁹ Cellstar Greiner bio-one (Poitiers, Frankreich)

²⁰ Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg

²¹ Schott (Mainz)

²² 1,5 halbmikro Küvetten, Brand (Wertheim)

²³ Pechiney (Düsseldorf)

Wurde für einen Arbeitstag eine Bakteriensuspension benötigt, ist diese stets am Vortag frisch vorbereitet worden.

4.8. Herstellung der Wurzelstücke

Für die durchgeführten Versuche wurden zahlreiche Wurzelstücke von Rinderzähnen mit 4 und 6 mm Dicke benötigt. Deren technische Herstellung wird im Folgenden beschrieben.

4.8.1. Gewinnung der Rinderzähne

Die Grundlage bildeten Rinderzähne, die aus den Unterkiefern frisch geschlachteter Rinder extrahiert wurden. Das Alter der Rinder lag zwischen 1,5 und 4,5 Jahren. Es wurden lediglich voll entwickelte, bleibende Frontzähne verwendet. Diese wurden unmittelbar nach der Extraktion zur Konservierung in 250 ml Schott-Gläser²⁴ gegeben, die 0,5%ige Chloramin T Lösung²⁵ enthielten, und vom Schlachthof²⁶ ins Labor gebracht.

4.8.2. Aufbereitung der Rinderzähne

Im Labor wurden die Zähne sofort in frische 0,5%ige Chloramin T Lösung und in neue Gläser überführt. Mit einem Skalpell²⁷ wurden Reste des parodontalen Gewebes entfernt und die Rinderinzisivi erneut in frische Chloramin T Lösung und neue Gläser gegeben. Nach einer einwöchigen Lagerung bei 7,5 °C im Kühlschrank wurden die Zähne schließlich in voll entsalztes Wasser überführt. Die Zähne wurden bis zu ihrer Verwendung gekühlt aufbewahrt, die Flüssigkeit wurde wöchentlich gewechselt.

Bevor mit einem Innenloch-Sägemikrotom²⁸ (vgl. Abb. 3) einzelne Wurzelstücke aus einem Zahn geschnitten werden konnten, mussten zunächst zwei Drittel der Zahnkrone mit Handstück²⁹ und Trennscheibe³⁰ abgetrennt werden. Anschließend wurde der Zahn mit

²⁴ Schott (Mainz)

²⁵ Artikelnummer 1.02426, Merk (Darmstadt)

²⁶ Schlachthof Vion (Furth im Wald)

²⁷ Feather Safety Razor Co. (Osaka, Japan)

²⁸ 1600 Leitz (Wetzlar)

²⁹ Mikromotor: K9, KAVO, Handstück: 10A, KAVO (Biberach/Riß)

³⁰ Nr. 196 090, Komet (Lemgo)

PalaDur Autopolymerisat³¹ auf einem zum Mikrotom gehörenden Objektträger fixiert, wobei die Wurzelspitze senkrecht nach oben stand und nur der Rest der verbliebenen Zahnkrone im Kunststoff steckte (vgl. Abb. 4). Damit die Zähne aufgrund der Wärmeentwicklung beim Abbinden des Kunststoffs keinen Schaden erlitten, wurden sie, nachdem der Kunststoff formstabil war, bis zu dessen vollständiger Aushärtung in kaltes Wasser aus dem Wasserhahn gelegt.



Abbildung 3: Das Sägemikrotom zum Schneiden der Zahnstücke



Abbildung 4: Mit Kunststoff gesockelter Rinderzahn

Nach Anbringen eines gesockelten Zahnes in die Innenlochsäge wurde mit dem Schneiden der Zähne begonnen (vgl. Zahnschema Abb. 5). Zunächst wurde die Wurzelspitze unter ständiger Wasserkühlung abgetrennt, sodass die Pulpa mit einer Exstirpationsnadel³² (ISO-Größe 35) aus dem eröffneten Wurzelkanal entfernt werden konnte. Dieses ca. 1-2 mm dicke Zahnstückchen wurde verworfen.

Anschließend wurde das nächste Stück mit einer Dicke von 4 mm abgetrennt. Dieses apikale Stückchen diente als Sterilkontrolle und wurde ebenfalls unter ständiger Wasserkühlung vom Rest der Wurzel getrennt. Die Außenfläche des Stückes war mit Bleistift mit seiner

³¹ Heraeus Kulzer (Hanau)

³² ISO-Größe 35, VDW-Dental GmbH (München)

entsprechenden Zahnnummer und dem Buchstaben a versehen worden, bevor es in ca. 60 ml frisch hergestelltes, noch nicht autoklaviertes Medium gegeben wurde. Dieses befand sich in einer 100 ml Schottflasche³³, welche ebenfalls mit der Zahnnummer beschriftet war, um die einzelnen Stücke stets identifizieren zu können. Ebenso wurde mit den nächsten beiden, 6 mm dicken Zahnstückchen b und c verfahren, welche später als Infektionskontrolle bzw. Desinfektionsprüfkörper verwendet werden sollten. Der mediane Anteil b diente dabei stets als Infektionsstück, der koronale Anteil c als Desinfektionsstück. So befanden sich in jedem Gläschen schließlich drei Zahnstücke (vgl. Abb. 6), jeweils einem Rinderzahn entstammend, die anschließend bei 121 °C und 1,96 bar Druck für 20 min autoklaviert wurden. Die auf Raumtemperatur abgekühlten, sterilen Flaschen wurden bis zum Versuchsstart im Kühlschrank bei 7,5 °C aufbewahrt. Die Dauer dieser Zwischenlagerung hat 2 Tage nie überschritten. Pro Versuchsdurchlauf wurden jeweils fünf Zähne auf diese Weise vorbereitet.

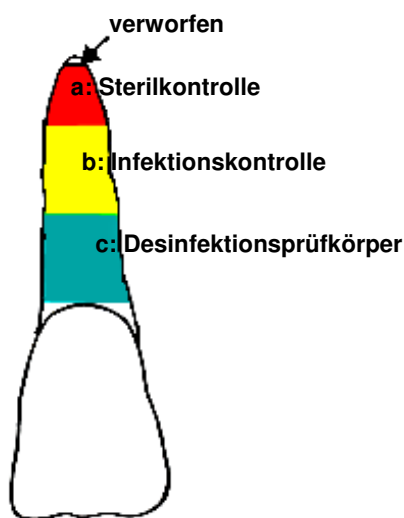


Abbildung 5: Zahnschema zum Schneiden der Stücke a, b und c

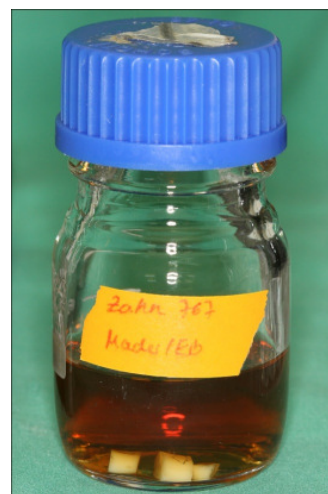


Abbildung 6: Die drei Zahnstücke des Zahnes 767 nach der Autoklavierung in sterilem Medium

4.9. Versuchsablauf

Alle nun beschriebenen Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt, um eine Kontamination der sterilen Wurzelstücke mit Umgebungskeimen zu verhindern. Jeder in die sterile Werkbank eingebrachte Gegenstand wurde vorher gründlich mit 70%igem Ethanol

³³ Schott (Mainz)

desinfiziert. Lediglich das Spalten der Zahnstücke und das Ausplattieren der Bohrspansuspension fanden aus technischen Gründen auf dem Labortisch statt. Einen schematischen Überblick über den Versuchsablauf verschafft Tabelle 1.

Versuchstag	Zeitansatz	Arbeitsschritte
1	0 h	Kleben der Zahnstücke; a mit Medium, b und c mit Bakteriensuspension befüllt; Inkubation
2	Nach 24 h	Mediumwechsel bei a, Wechsel der Bakteriensuspension bei b und c
3	Nach 48 h	Keine Veränderungen (Ruhetag)
4	Nach 72 h	Mediumwechsel bei a, Austausch der Bakteriensuspension gegen Medium bei b und c
5	Nach 96 h	Keine Veränderungen (Ruhetag)
6	Nach 120 h	Mediumwechsel bei a, b und c
7	Nach 144 h	a und b aus den Petrischalen gelöst; c desinfiziert und aus der Petrischale gelöst; Spalten der Zahnstücke; Probenentnahme in 0,5 mm, 1,0 mm und 1,5 mm Tiefe; Aufbewahrung der Bohrspäne in Medium; Ausplattieren von 100 µl Bohrspansuspension auf Enterokokken-Platten
8	Nach 168 h	Auszählen der Kolonien

Tabelle 1: Zeitschema

4.9.1. Versuchstag 1

Zunächst wurden alle Zahnstücke in Petrischalen³⁴ geklebt, wobei die Sterilkontrollen a jeweils eine separate Schale erhielten, um eine Kontamination durch die Infektionskontrolle b und die Desinfektionsprüfkörper c zu vermeiden. Zahnstück b und c wurden nebeneinander in einem Abstand von ca. 4 cm in einer weiteren Petrischale befestigt. Die Zahnstückchen wurden mit einer sterilen Pinzette aus der Schottflasche entnommen und vor dem Kleben behutsam mit einem sterilen Zellstofftuch³⁵ abgetupft, um eine trockene Oberfläche für den Befestigungszement zu schaffen. Es wurde der dualhärtende Composite-

³⁴ Größe 94/16, Cellstar greiner bio-one (Frickenhäusen)

³⁵ Novotex (Krefeld)

Befestigungszement RelyX Unicem³⁶ verwendet, welcher vor Applikation aktiviert und für 15 sec im Kapselmischgerät³⁷ gerüttelt wurde. Das Material wurde direkt von der Aplicap-Kapsel auf die Ränder der Unterseite des Zahnstückes gegeben, sodass das Kanallumen beim Andrücken des Wurzelstückchens in die Petrischale frei von Material blieb und gleichzeitig das Kanallumen von außen gegen andere Flüssigkeiten abgedichtet war. Es erfolgte die Polymerisation von unten und von oben für jeweils 40 sec mit einer Polymerisationslampe³⁸, die Proben wurden anschließend für 10 min bis zur vollständigen Aushärtung des Composites stehen gelassen.

Zur Schaffung eines feuchten Milieus in der Petrischale wurde eine Schicht aus zwei autoklavierten Zellstofftüchern, in Form und Größe der Schale, hineingelegt. An der Stelle, an der das Zahnstück in der Schale klebte, wurde aus den Tüchern ein Loch geschnitten, sodass das Zahnstück von den Tüchern nicht berührt wurde. Die angepassten Zellstofftücher wurden mit 5 ml sterilem 18 Ω -Millipore Wasser befeuchtet. Die Wurzelkanäle der Proben wurden mit unterschiedlichen Flüssigkeiten gefüllt und sodann mit einem runden Deckgläschen³⁹ abgedeckt (vgl. Abb. 7).

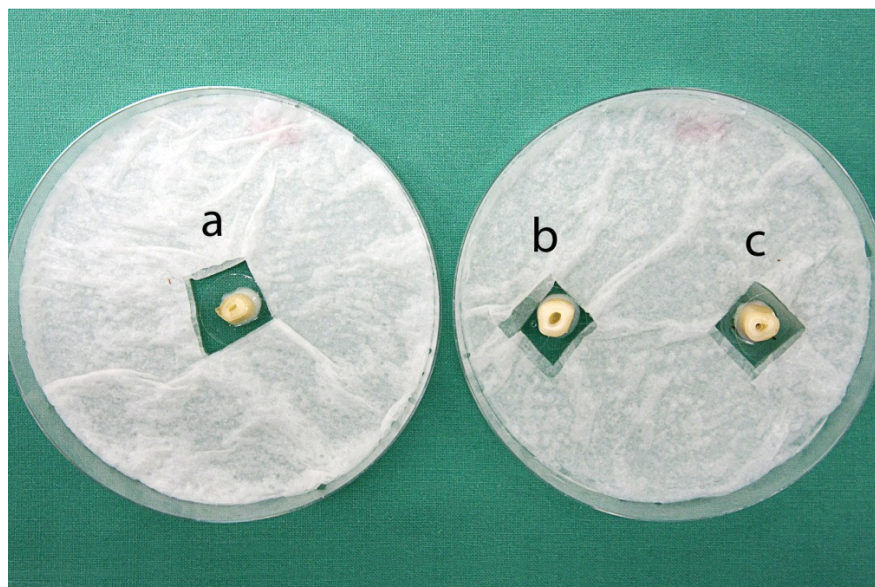


Abbildung 7: Drei Zahnstücke eines Rinderzahnes in Petrischalen geklebt: Sterilkontrolle a (linke Petrischale), Infektions- b (rechte Petrischale, linkes Stück) und Desinfektionsprüfkörper c (rechte Petrischale, rechtes Stück)

³⁶ 3M ESPE (Neuss)

³⁷ Silamat S3, Vivadent (Schaan, Fürstentum Liechtenstein)

³⁸ Optilux 400, Demetron (Danbury, USA)

³⁹ 15x15 superior, Marienfeld (Königshofen)

Hierbei befand sich nun im Lumen aller Sterilkontrollen a ausschließlich steriles Medium, in den Infektionskontrollen b und Desinfektionsprüfkörper c die am Vortag vorbereitete *E. faecalis* Bakteriensuspension. Diese wurde vor Gebrauch bei 600 nm Wellenlänge mit sterilem Medium als Referenzwert in Einmalküvetten im Photometer⁴⁰ optisch vermessen. Substanzen, deren Extinktion einen Wert von 1,100 unterschritten, wurden im Versuch nicht verwendet. Um eine Kontamination der Sterilkontrollen mit dem *E. faecalis* auszuschließen, wurden diese als erstes mit Medium befüllt und die Petrischalen wieder verschlossen, bevor die zu infizierenden Proben mit Bakteriensuspension beimpft wurden. Grundsätzlich wurden bei jedem Arbeitsschritt die Sterilkontrollen vor den Infektions- und Desinfektionsprüfkörper behandelt. Die Petrischalen wurden stets einzeln und nacheinander bearbeitet, wobei für jeden Arbeitsvorgang neue Pipettenspitzen⁴¹ und Stripetten⁴² verwendet wurden. Um die Sterilität des Mediums zu gewährleisten, wurde dieses in kleinen Portionen gelagert und die Reste nach Gebrauch verworfen. Dieses Vorgehen gilt für den ganzen Versuch.

Alle fertig vorbereiteten Petrischalen wurden im Inkubator bei 37 °C bebrütet. Bei der Inkubation herrschten dieselben Bedingungen, bei denen die Arbeitskulturen für 24 h heranwuchsen. Eine solche musste am ersten Versuchstag, wie unter 4.7. beschrieben, nochmals für den folgenden Arbeitstag angelegt werden.

4.9.2. Versuchstag 2

Nach 24-stündiger Inkubation der Proben wurde zunächst bei den Sterilkontrollen a das Medium gewechselt. Dazu wurden die Deckgläschen mit einer sterilen Pinzette von den Wurzelstücken abgenommen und verworfen. Der Inhalt der Kanallumina wurde abpipettiert, frisches steriles Medium in den Kanal gefüllt und das Zahnstück wieder mit einem neuen Deckgläschen versehen. Anschließend wurden noch 4 ml steriles 18 Ω Millipore Wasser auf die Zellstofftücher gegeben, um das feuchte Milieu in der Kammer zu erhalten und somit ein Austrocknen der Zahnstückchen zu vermeiden. Waren die Petrischalen der Sterilkontrollen wieder verschlossen, erfolgte dieselbe Behandlung mit den infizierten Proben b und c. Hierbei wurde die Bakteriensuspension gegen die am Vortag angeimpfte Arbeitskultur ausgetauscht, welche vorher wiederum bei 600 nm optisch vermessen wurde. Es folgte

⁴⁰ Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences (Little Chalfont, Großbritannien)

⁴¹ Sarstedt (Nümbrecht)

⁴² Cellstar greiner bio-one (Frickhausen)

analog zu den Sterilkontrollen die Zugabe von je 4 ml sterilem 18 Ω Millipore Wasser für die feuchte Kammer. Schließlich wurden die Petrischalen für weitere 48 h unter den oben beschriebenen Bedingungen im Brutschrank inkubiert.

4.9.3. Versuchstag 3

An diesem Tag wurden keine Veränderungen an den Proben vorgenommen.

4.9.4. Versuchstag 4

Nach 48 h wurde zunächst wie unter 4.9.2. beschrieben ein Mediumwechsel in den Sterilkontrollen a durchgeführt. Zum Erhalt der feuchten Kammer kamen dieses Mal je 3 ml steriles 18 Ω Millipore Wasser auf die Zellstofftücher. Im Unterschied zu Versuchstag 2 wurden jedoch die Infektions- und Desinfektionsprüfkörper b und c nach dem Abpipettieren des Kanalinhalts nicht mehr mit einer frischen Bakteriensuspension beimpft, sondern wie die Sterilkontrollen a mit sterilem Medium, da nach 3 Tagen davon ausgegangen werden konnte, dass genügend Bakterien in die Dentintubuli eines Zahnstückes eingedrungen waren und an der Kanalwand hafteten. Das Nährmedium im Kanallumen diene nun dazu, die sich im Wurzelstück befindlichen Bakterien zu erhalten und ihre Vermehrung zu begünstigen.

Für weitere 48 h wurden die Proben im Inkubator aufbewahrt.

4.9.5. Versuchstag 5

An diesem Tag wurden keine Veränderungen an den Proben vorgenommen.

4.9.6. Versuchstag 6

Nach weiteren 48 h wurde in allen Zahnstücken ein Mediumwechsel durchgeführt und nochmals 2 ml steriles Wasser zur Befeuchtung der Kammer hinzugegeben. Für weitere 24 h wurden die Petrischalen inkubiert.

4.10. Versuchstag 7, Versuchsende

Am siebten Tag erfolgte schließlich die Probenentnahme aus den für 6 Tage bebrüteten Zahnstücken. Auch wurden die Sterilkontrollen vor den infizierten Kontrollstücken bearbeitet, um eine Kontamination mit Keimen zu verhindern. Zunächst wurden zwei 24-Well-Platten⁴³ vorbereitet, indem jede Kammer mit 2 ml sterilem 0,9%igem NaCl befüllt wurde. Durch das Lösen der entsprechenden Menge NaCl⁴⁴ in 18 Ω-Millipore Wasser und die anschließende Autoklavierung wurde die Lösung idealerweise am Vortag selbst hergestellt. Die Deckgläschen auf den Sterilkontrollen wurden verworfen, der Kanalinhalt wurde abpipettiert und das Zahnstückchen mit einer sterilen Pinzette aus der Petrischale herausgelöst. Bis zum Spaltvorgang lagerten die entnommenen Stücke in je einer Kammer der mit 0,9%igen NaCl gefüllten 24-Well-Platte. Ebenso wurde mit den Infektionskontrollen b verfahren. Lediglich die Desinfektionsprüfkörper c verblieben noch bis zur Desinfektion in ihrer Schale.

4.10.1. Desinfektion

Je nach Versuch wurden die c-Stücke mit unterschiedlichen Konzentrationen von NaOCl für verschiedene Zeiten desinfiziert. Pro Versuchsgruppe wurden zehn Zähne untersucht. Einen Überblick über die Desinfektionsbedingungen verschafft Tabelle 2.

NaOCl-Konzentration	Einwirkzeiten
0,5%	30 sec (gestoppt)
	60 sec (gestoppt)
1,0%	30 sec (gestoppt)
	60 sec (gestoppt)
3,0%	30 sec (gestoppt)
	60 sec (gestoppt)

Tabelle 2: Desinfektionsschema

⁴³ Tissue Culture Cluster 4, Costar (Cambridge, USA)

⁴⁴ Artikelnummer 1.06406, Merck (Darmstadt)

Vor der eigentlichen Desinfektion wurde wie bei den Zahnproben a und b das Deckgläschen mit einer sterilen Pinzette entfernt und der Kanalinhalt verworfen. Anschließend wurde das NaOCl mit einer sterilen Pipette in den Wurzelkanal eingebracht und für 30 bzw. 60 sec belassen (vgl. Abb. 8 und 9).

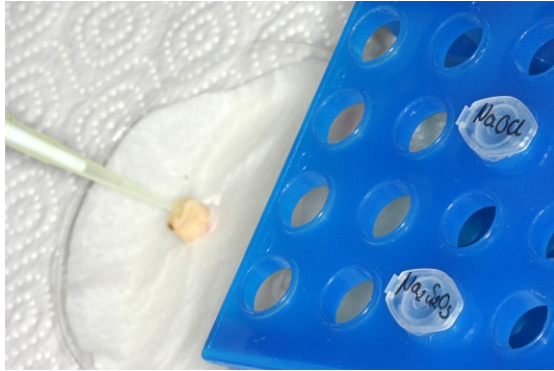


Abbildung 8: Desinfektionsvorgang. Das NaOCl wird mit einer sterilen Pipettenspitze in den Wurzelkanal eingebracht



Abbildung 9: Detailansicht der Befüllung des Wurzelkanals mit NaOCl

Nach der jeweiligen Desinfektionszeit wurde das Agens aus dem Kanal entnommen und bei jeder Untersuchungsgruppe sofort mit der 22%igen Natriumthiosulfat-Lösung inaktiviert, um ein unkontrolliertes Nachwirken des Desinfektionsmittels zu vermeiden. Die Stopperlösung wurde für 30 sec im Kanallumen belassen und anschließend abpipettiert. Somit wurden ausschließlich gestoppte Desinfektionen durchgeführt. Nach dem Desinfektionsvorgang wurden die Zahnstücke mit einer sterilen Pinzette aus der Petrischale gelöst und einzeln in die Kammern einer 24er Well-Platte, welche mit je 2 ml physiologischer Kochsalzlösung befüllt waren, überführt. Dort lagerten sie bis zum Spaltvorgang.

4.10.2. Herstellung der Zahnstückhälften

Nachdem alle c-Stücke desinfiziert worden sind, erfolgte nun das Spalten der Wurzelstücke, um Proben von der Kanaloberfläche ausgehend entnehmen zu können. Der Spaltvorgang erfolgte aus technischen Gründen außerhalb der Sterilbank. Zunächst wurde die Arbeitsfläche mit 70% Ethanol gründlich desinfiziert und mit autoklavierten Zellstofftüchern ausgelegt. Es wurde ein Zahnstück auf das Tuch gelegt, an seiner Mitte mit einem sterilen Wachsmesser⁴⁵ fixiert und mit einem weiteren autoklavierten Tuch bedeckt. Das obere Tuch

⁴⁵ Artikel-Nr.: 9001650, Henry Schein Dental Depot (Langen)

diente hierbei als Schutz, damit die entstandenen Zahnstücke nicht wegsprangen. Mit einem desinfizierten Hammer wurde das Zahnstück in zwei Hälften getrennt (vgl. Abb 12 auf Seite 35). Diese kamen unmittelbar nach dem Spalten in frische, sterile 0,9%ige NaCl-Lösung in der zweiten vorbereiteten Well-Platte, in der sie bis zum Bohrvorgang verblieben. Um eine Kontamination von einem Zahnstück auf ein anderes zu vermeiden, wurden wiederum als erstes die Sterilkontrollen, nachfolgend die Desinfektionsprüfkörper und zuletzt die Infektionskontrollen behandelt; es kamen stets frische Tücher zum Einsatz und die Instrumente wurden zwischen den einzelnen Zahnstücken desinfiziert bzw. mit dem Bunsenbrenner abgeflammt.

4.10.3. Probengewinnung

Die Proben aus den Zahnstückhälften wurden mit Hilfe von sterilen Rosenbohrern⁴⁶ (Durchmesser: 0,8 mm) gewonnen. Dazu verwendete man einen inklusive Zubehör vollständig autoklavierbaren Bohrständer⁴⁷, der es ermöglichte, Präzisionsbohrungen in 10 µm Genauigkeit durchzuführen (vgl. Abb. 10). Dieser war kompatibel mit dem zahnärztlichen Handstück und dessen Motor⁴⁸.

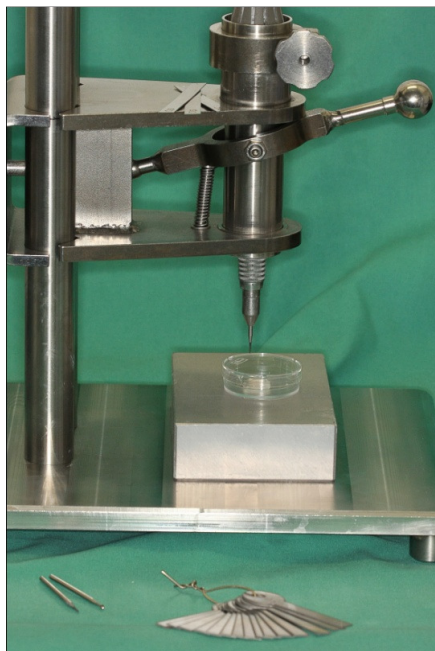


Abbildung 10: Der selbst entwickelte, voll autoklavierbare Bohrständer

⁴⁶ 0,8mm Rosenbohrer, Komet (Lemgo)

⁴⁷ Mechanikwerkstatt Biologie der Universität Regensburg

⁴⁸ Siehe auch 4.8.2: Aufbereitung der Zahnstücke

Die Zahnhälften wurden jeweils mit der Wurzelaußenwand nach unten zeigend am Boden einer kleinen, sterilen Petrischale⁴⁹ mit Heißkleber⁵⁰ befestigt, damit diese beim Bohren an derselben Stelle blieben (vgl. Abb. 11). Dazu mussten die Zahnstücke vor dem Kleben mit einem sterilen Zellstofftuch abgetupft und getrocknet werden. Wichtig war, dass die Zahnstücke erst unmittelbar vor der Bohrung aus der Well-Platte entnommen und auf ihren Trägern fixiert wurden, da sonst eine Gefahr der Austrocknung bestand.

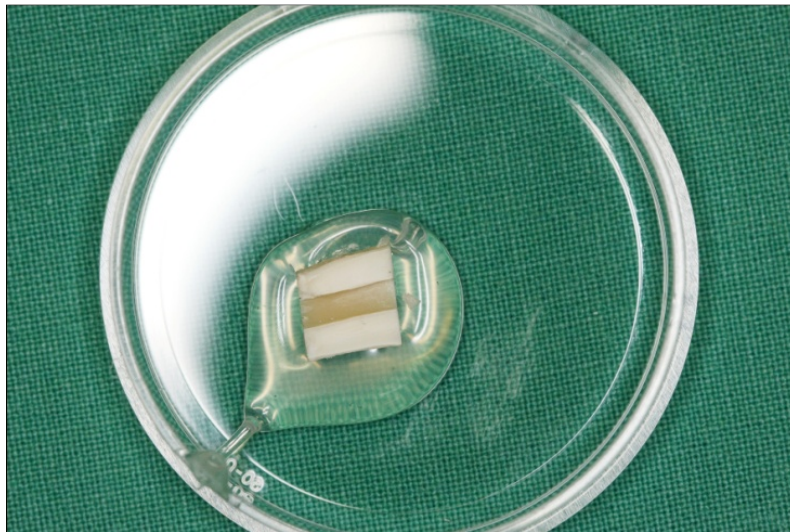


Abbildung 11: Eine mit Heißkleber in der Petrischale befestigte Zahnstückhälfte kurz vor dem Bohrvorgang

Die im Schälchen befestigten Zahnstückhälften wurden vor dem Bohren noch einmal abgespült, um einen Überschuss an Bakterien, der sich an der Wurzelkanaloberfläche befand, zu entfernen. Das Abspülen erfolgte mit 5 – 10 ml sterilem 0,9%igem NaCl, das mit einer 10 ml Spritze⁵¹ und stumpfem Kanülenaufsatz⁵² einem sterilen Becherglas⁵³ entnommen wurde. Schließlich waren nur die Bakterien, die in die Dentintubuli eingewandert waren, für den Versuch relevant.

Nun schloss sich der Bohrvorgang an, der nach folgendem Schema durchgeführt wurde:

⁴⁹ Größe 60/15, Cellstar Greiner bio-one

⁵⁰ HKP220, Proxxon (Niersbach)

⁵¹ BD 10ml Syringe, BD (Franklin Lakes, USA)

⁵² Miraject PL Super, Hager & Werken (Duisburg)

⁵³ Schott Duran, Schott (Mainz)

Sterilkontrollen a:

2 Hälften, pro Hälfte 1 Bohrschicht: 0 mm – 1,0 mm

Infektionskontrollen b und Desinfektionsprüfkörper c:

2 Hälften, pro Hälfte 2 Bohrspanentnahmestellen (Bohrloch),
pro Bohrloch 3 Bohrschichten:

0 mm - 0,5 mm; 0,5 mm - 1,0 mm; 1,0 mm - 1,5 mm

Hierbei wurde der Bohrer immer senkrecht zur Wurzelkanaloberfläche angesetzt. Zur Illustration des Bohrvorgangs bei den Infektions- und Desinfektionsprüfkörper dient Abbildung 12.

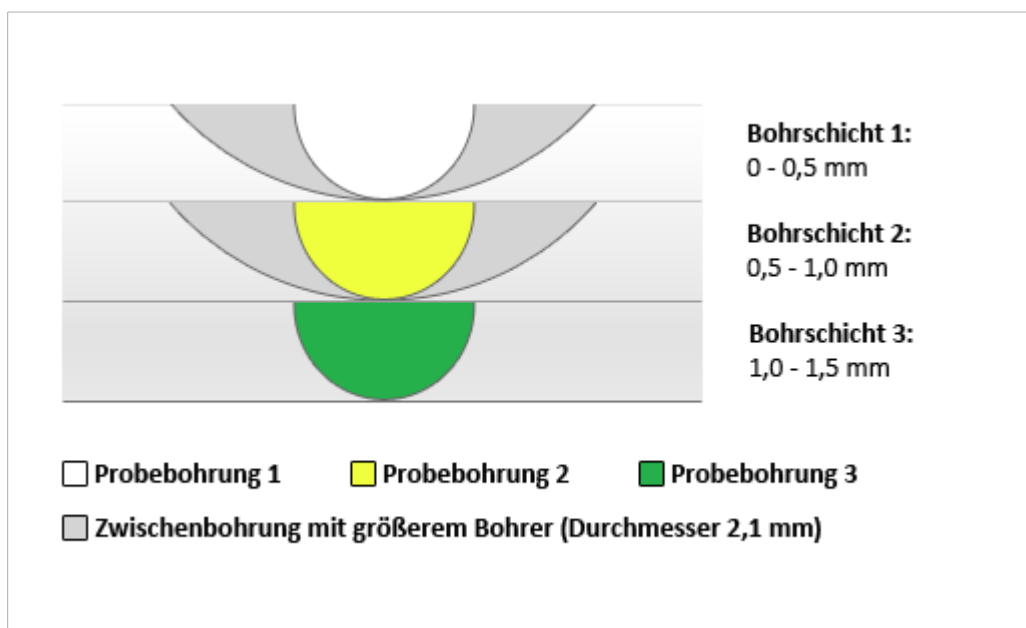


Abbildung 12: Illustrierter Bohrvorgang. Die drei kleinen Halbkreise (weiß, gelb und grün) stellen die Probenbohrungen (Durchmesser 0,8 mm) in den unterschiedlichen Bohrschichten dar. Die beiden großen Halbkreise (grau) stehen für die Zwischenbohrungen mit einem größeren Rosenbohrer (Durchmesser 2,1 mm), welche nach der ersten und zweiten Probenbohrung durchgeführt wurden. Rechts neben der Illustration sind die drei Bohrschichten angegeben

Die Reihenfolge, die beim Spalten der Zahnstücke vorgenommen wurde, behielt man auch bei der Gewinnung der Proben bei, d.h. man bohrte als erstes die Zahnstücke a, dann die desinfizierten Stücke c und zuletzt die Infektionskontrollen b. Zwischen den Kontrollgruppen c und b wurden die sterile Werkbank und der Bohrständer zusätzlich mit 70%igem Ethanol desinfiziert.

Waren die Zahnhälften in die kleinen Petrischalen geklebt und nochmal gründlich abgespült worden, konnte mit der ersten Bohrung (Rosenbohrer mit Durchmesser 0,8 mm) begonnen werden (vgl. Abb. 13). Bei den Sterilkontrollen wurde aus den Hälften nur jeweils eine Probe bis 1,0 mm Tiefe entnommen, da dies ausreichte, um eine Sterilität der Probe festzustellen. Die entstandenen Bohrspäne wurden mit 1 ml sterilem Medium umspült (vgl. Abb. 14), mit einer 1 ml-Stripette aufgesaugt und in einem 15 ml-Falcon⁵⁴ aufgefangen, in dem sich nochmals 1 ml Medium befand. Um diesen Arbeitsschritt zu vereinfachen, wurden am Vortag mit einer Multi-Pipette⁵⁵ jeweils 2 ml steriles Medium in 15 ml-Falcons gefüllt, von dem die Hälfte entnommen und zum Auffangen der Bohrspäne verwendet werden konnte. Der benutzte Bohrer wurde ebenfalls immer in das zugehörige Falcon-Röhrchen gegeben, um einen Verlust an Bohrspänen zu vermeiden (vgl. Abb. 15). Die gebohrten Zahnstücke wurden sodann mitsamt der Petrischale entsorgt.



Abbildung 13: Der Bohrvorgang



Abbildung 14: Abspülen der Bohrspäne vom Zahnstück in die Petrischale; anschließend wurden sie mit der Stripette aufgesaugt und in ein Falcon-Röhrchen überführt

⁵⁴ 15 ml PP-Test tubes, Cellstar Greiner bio-one (Poitiers, Frankreich)

⁵⁵ Eppendorf (Hamburg)

Waren alle Sterilkontrollen bearbeitet, erfolgte für die Desinfektions- und Infektionsprüfkörper ein ähnliches Verfahren. Pro Zahnhälfte entstanden zwei Bohrlöcher, aus denen jeweils eine Probe in 0,5 mm, 1,0 mm und 1,5 mm entnommen wurde. Es wurde mit der 0,5 mm-Bohrung begonnen und die Bohrspäne wie beschrieben in ein Falcon-Röhrchen gespült. Das entstandene Bohrloch wurde mit einem größeren Rosenbohrer⁵⁶ (Durchmesser 2,1 mm) erweitert, um die zweite Tiefenbohrung zu erleichtern und für diese die gleiche Menge an Bohrspäne zu erhalten. Die dabei entstandenen Späne wurden mit 5 – 10 ml sterilem NaCl gründlich abgespült und verworfen, die Petrischale wurde zusätzlich mit einem sterilen Zellstofftuch ausgetupft. Nun konnte mit der zweiten Bohrung an derselben Stelle in weiteren 0,5 mm Tiefe fortgefahren werden. Analog wurde auch bei der dritten Tiefenbohrung vorgegangen. War der Bohrvorgang an einer Stelle beendet, wurde das Bohrloch mit einer geringen Menge Heißkleber verschlossen, bevor die erste Bohrung an der zweiten Bohrstelle des Zahnstückes erfolgen konnte. Auf diese Weise entstanden für jedes b und c - Stück pro Bohrschicht vier Proben.

Da dieser Arbeitsschritt einige Stunden Zeit in Anspruch nahm, wurden die Proben bis zum Ausplattieren im Kühlschrank bei 7,5 °C zwischengelagert.

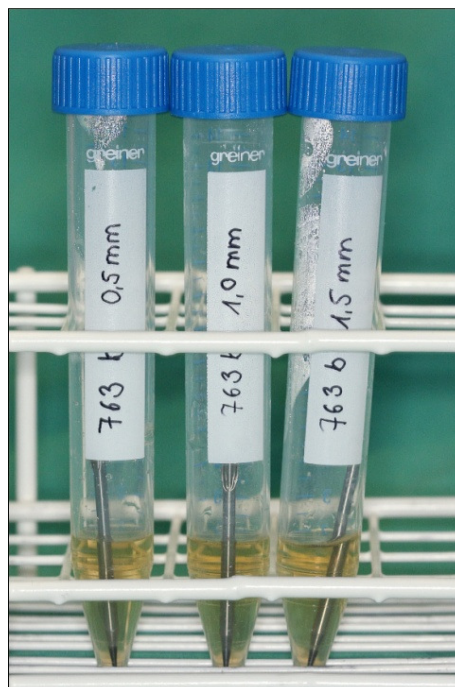


Abbildung 15: Drei Bohrspänpoden einer Lokation aus den unterschiedlichen Bohrschichten in sterilem Medium

⁵⁶ 2,1mm Rosenbohrer, Komet (Lemgo)

4.10.4. Wachstumskulturen

Die Falconröhrchen mit den gewonnenen Bohrspänen und den Bohrern wurden für 5 sec mit einem Vortex aufgeschüttelt und 100 µl davon auf Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden mit einem sterilen Drigalski⁵⁷ Spatel ausgestrichen. Von den Infektions- und Desinfektionsprüfkörpern wurde zusätzlich für jede Probe eine 1:100 Verdünnung hergestellt und ausplattiert. Aus Platzgründen konnten diese Arbeitsschritte nicht unter der Sterilbank durchgeführt werden. Alle Platten wurden im Anschluss für 24 h bei 37 °C inkubiert.

4.10.5. Kolonien

Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden aus dem Brutschrank entnommen und die auf ihnen gewachsenen Kolonien gezählt. Die Ergebnisse wurden festgehalten und später ausgewertet.

4.11. Datenerhebung und statistische Analyse

4.11.1. Auszählen der koloniebildenden Einheiten

Wie unter 4.10.5. beschrieben wurden nach einer Inkubationszeit von 24 h die koloniebildenden Einheiten auf allen Enterokokken-Platten gezählt. Eine Leuchtplatte verschaffte beim Auszählen eine bessere Übersicht, da die Enterokokken-Kolonien um sich herum einen schwarzen Vorhof aus Stoffwechselprodukten bildeten. War ein Wert der Desinfektions- bzw. Infektionsergebnisse auf den Platten unzählbar, wurde der Wert der entsprechenden 1:100 Verdünnung mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und zur Auswertung herangezogen. Ansonsten fiel die Entscheidung, welcher Wert verwendet wurde, automatisch auf den unverdünnten Wert, da dieser genauer bestimmt werden konnte.

⁵⁷ Drigalski-Spatel, Edelstahl rostfrei, Lieferant VWR-Versand

4.11.2. Statistische Auswertung

Die erfassten Daten wurden in eine computerlesbare Form überführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS 15.0⁵⁸ für Windows. Die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde mit SPSS SigmaPlot 8.0⁵⁹ durchgeführt.

Pro Untersuchungsgruppe wurden zehn Stichproben untersucht, für die pro Bohrschicht jeweils vier Werte erhoben werden konnten. Für die vier Werte einer Stichprobe wurde der Median als repräsentativer Wert herangezogen. Daraus wurden wiederum der Median und das 25%- bzw. 75%-Quartil für alle Proben berechnet und grafisch dargestellt. Als Testparameter wurde die relative Anzahl der verbliebenen Kolonien nach Desinfektion bezogen auf die aus demselben Zahn gewonnene Infektionsprobe verwendet, d.h. jeder Zahn war seine eigene Kontrolle. Niemals wurde die Desinfektionsergebnis eines Zahnes zur Infektionskontrolle eines anderen Zahnes in Relation gestellt. Die relative Anzahl der verbliebenen Kolonien nach Desinfektion wurde logarithmisch dargestellt. Die Desinfektion galt als biologisch relevant, wenn eine Reduktion von mindestens 3 log₁₀-Stufen erreicht wurde, was bedeutet, dass der mediane Wert im Falle einer erfolgreichen Desinfektion bei $\leq 0,1\%$ zu liegen hatte [11].

4.12. Vorbereitung der Proben für die rasterelektronenmikroskopische Visualisierung

Zur Darstellung der Kontamination der Dentintubuli mit Mikroorganismen wurden exemplarisch einige Bilder von Zahnstückhälften angefertigt. Bevor die Proben mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops untersucht werden konnten, mussten sie vorbehandelt werden.

Zunächst wurden die noch ungespaltenen Zahnstücke drei Mal mit 0,9%igem NaCl steril gewaschen, um auf der Oberfläche des Wurzelkanals haftende Proteine des Nährmediums abzuspielen. Es erfolgte nochmals ein Waschvorgang in 0,1 M Sørensen-Phosphat-Puffer⁶⁰. Anschließend wurden die Zahnstücke fixiert, indem sie für 2 h in eine Mischung⁶¹ aus 2,5%

⁵⁸ SPSS Inc., Chicago (USA)

⁵⁹ Sigma Plot Version 8.0, Chicago (USA)

⁶⁰ Hergestellt aus KH₂PO₄ und Na₂HPO₄, gelöst in Aqua bidest.; Zusammensetzung siehe Anhang

⁶¹ Zusammensetzung der Fixierlösung: siehe Anhang

Glutaraldehyd⁶² in 0,1 M Sørensen-Phosphat-Puffer gelegt wurden. Danach wurden die Proben noch drei Mal in 0,1 M Sørensen-Phosphat-Puffer für je 30 min gewaschen. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Zahnstücke in 0,1 M Sørensen-Phosphat-Pufferlösung im Kühlschrank gelagert. Vor der Aufnahme der elektronenmikroskopischen Bilder wurden die Zahnstücke wie gehabt gespalten (siehe auch 4.10.2.) und ein letztes Mal mit Aqua bidest. gewaschen, um Puffersalze von der Zahnoberfläche zu spülen. Andernfalls würden die Salze bei Austrocknung ausfallen. Zur Untersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop wurden die Zahnstückhälften mit Leit-C-Plast⁶³ auf je einem Stub⁶⁴ befestigt. Im unbeschichteten, feuchten Zustand wurden die Proben im low-vacuum-Modus untersucht.

4.13. Testung der Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden

Da während der Vorversuche in Anlehnung an vorhergehende Arbeiten die Keimzahlbestimmung der Bohrspan suspensionen mittels Typticase-Soy-Broth-Agarplatten⁶⁵ (= Casoplatten) erfolgte, wurden die Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden (= Enterokokkenplatten) auf simultanes Bakterienwachstum überprüft. Hierfür wurde zunächst wie im Kapitel 4.7. beschrieben eine *E. faecalis* Arbeitskultur hergestellt. Aus dieser Kultur wurden Verdünnungen mit sterilem Typticase-Soy-Broth-Medium im Verhältnis 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 und 1:100000 hergestellt und jeweils 100 µl auf die beiden Nährböden ausplattiert. Es folgte die Inkubation der Proben für 24 h bei 37 °C und die anschließende Auszählung der koloniebildenden Einheiten auf allen Platten. Die Ergebnisse wurden vermerkt und später ausgewertet.

⁶² Glutaraldehyd für Elektronenmikroskopie, Nr. 23114, Serva (Heidelberg)

⁶³ Leit-C-Plast, Provac (Oestrich-Winkel)

⁶⁴ Aluminium Stub, Provac (Oestrich-Winkel)

⁶⁵ 94mm Agarplatten, Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg

5. Ergebnisse

5.1. Absolute Kolonienzahlen

5.1.1. Sterilkontrollen

Die Sterilkontrollen waren in keinem der durchgeführten Versuche mit dem *E. faecalis* infiziert. Die ausgestrichenen Bohrspanproben aus der Bohrschicht 0 – 1,0 mm zeigten kein Wachstum des Mikroorganismus auf den Enterokokkenplatten.

5.1.2. Infektionskontrollen

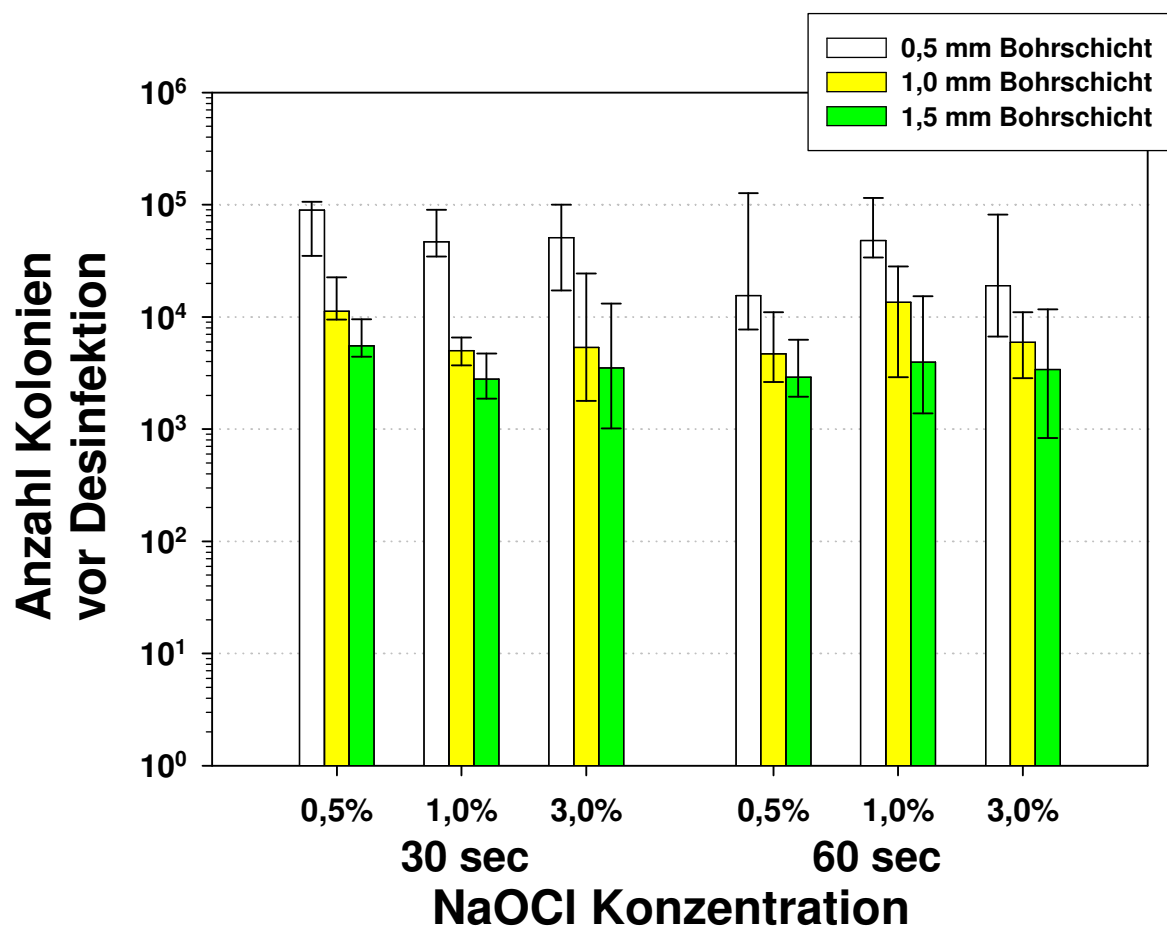


Abbildung 16: Anzahl der *E. faecalis* Kolonien in den zu den Desinfektionsprüfkörpern gehörigen Infektionskontrollen; Mediane mit 25%- und 75%- Quartilen

Die Anzahl der Kolonien lag bei den Infektionskontrollen b in der Bohrschicht 1 (0 – 0,5 mm) zwischen $1,55 \cdot 10^4$ und $8,95 \cdot 10^4$, in der Bohrschicht 2 (0,5 – 1,0 mm) zwischen $4,7 \cdot 10^3$ und $1,35 \cdot 10^4$ Kolonien und in der Bohrschicht 3 (1,0 – 1,5 mm) zwischen $2,8 \cdot 10^3$ und $5,52 \cdot 10^3$

Kolonien. Tendenziell zeichnet sich hierbei ein fallendes Tiefenprofil ab: In tiefere Dentinschichten (ausgehend vom Wurzelkanallumen) waren weniger Bakterien eingedrungen bzw. weniger Mikroorganismen hatten sich dort vermehrt als in der oberflächlichsten Dentinschicht. Die Unterschiede lagen innerhalb eines Bereichs von 1,7 \log_{10} -Stufen. Zur graphischen Darstellung des Tiefenprofils dient Abb. 16.

5.2. Relative Kolonienzahlen (\log_{10} -Stufen)

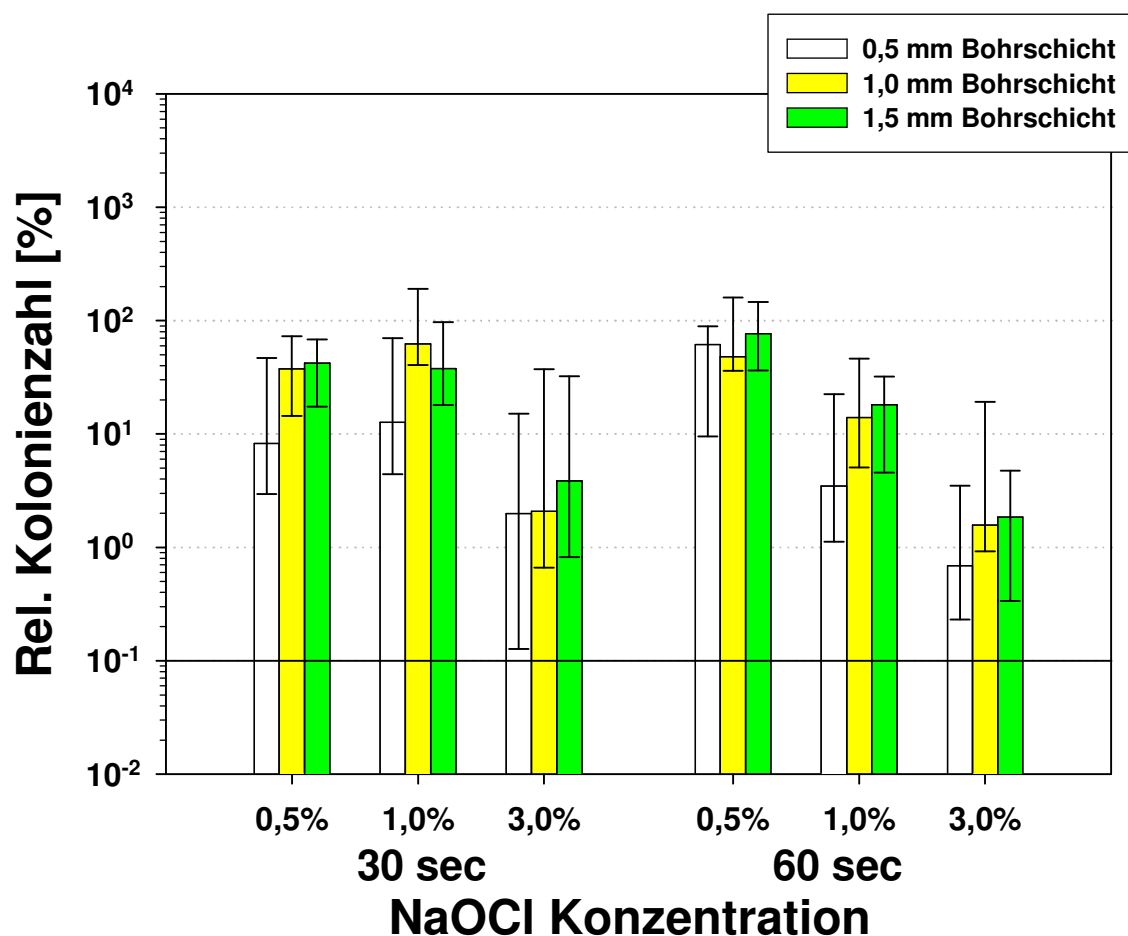


Abbildung 17: Relative Kolonienzahlen nach der Desinfektion für 30 sec bzw. 60 sec; Mediane mit 25%- und 75%-Quartilen; 100% = Infektion der b-Stücke

In Abbildung 17 werden die Desinfektionsergebnisse der unterschiedlichen Versuchsgruppen logarithmisch aufgezeichnet. Die horizontale Linie bei 10^{-1} % stellt hierbei die Schwelle für eine biologisch relevante Desinfektion von mindestens 3 \log_{10} Stufen dar, gemäß den Empfehlungen des Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) und des HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force [11]. Diese Schwelle wird in jeder

Versuchsgruppe überschritten, d.h. eine biologische relevante Desinfektion konnte nicht erreicht werden.

Die relativen Anzahlen der Kolonien zeigen für alle Konzentrationen und Einwirkzeiten von Natriumhypochlorit noch Bakterienwachstum. Betrachtet man zunächst die Werte für die Wirkungsdauer von 30 sec, so liegen die relativen Koloniezahlen bei der Verwendung von 0,5%igem NaOCl in Bohrschicht 1 (0 – 0,5 mm) bei 8%, in Bohrschicht 2 (0,5 – 1,0 mm) bei 38% und in Bohrschicht 3 (1,0 – 1,5 mm) bei 42%. Ähnliche Zahlen zeigen sich für die Desinfektion mit 1%igem NaOCl. Hier ergaben sich Werte von 13% für Bohrschicht 1 (0 – 0,5 mm), 62% für Bohrschicht 2 (0,5 – 1,0 mm) und 38% für Bohrschicht 3 (1,0 – 1,5 mm). Bei Anwendung von NaOCl in einer 3%igen Lösung findet man in Bohrschicht 1 (0 – 0,5 mm) noch 2%, in Bohrschicht 2 (0,5 – 1,0 mm) 2% und in Bohrschicht 3 (1,0 – 1,5 mm) 4% der Ausgangszahlen der Bakterienkolonien.

Für eine Einwirkzeit von einer Minute zeigten sich bei Anwendung von 0,5%igem Natriumhypochlorit noch eine relative Koloniezahl von 61% in Bohrschicht 1 (0 – 0,5 mm), in Bohrschicht 2 (0,5 – 1,0 mm) 48% und in Bohrschicht 3 (1,0 – 1,5 mm) noch 77%. Geringere Werte erhielt man mit 1%igem NaOCl als Desinfektionsagens. Hierbei erhielt man Werte von 4% für Bohrschicht 1 (0 – 0,5 mm), 14% für Bohrschicht 2 (0,5 – 1,0 mm) und 18% für Bohrschicht 3 (1,0 – 1,5 mm). Noch etwas weniger verbliebene Kolonien konnten nach der Verwendung von 3%igem NaOCl bei 60 sec Wirkdauer gefunden werden. Unter diesen Bedingungen zeigten sich in Bohrschicht 1 (0 – 0,5 mm) noch 1%, in Bohrschicht 2 (0,5 – 1,0 mm) 2% und in Bohrschicht 3 (1,0 – 1,5 mm) 2% der Koloniezahlen der zugehörigen Infektionskontrollen.

5.3. Rasterelektronenmikroskopische Bilder

Zur exemplarischen Visualisierung der Versuchsergebnisse wurden einige Zähne mit dem Rasterelektronenmikroskop⁶⁶ untersucht.

⁶⁶ FEI Quanta 400 FEG, FEI Deutschland GmbH (Frankfurt/Main)

Abbildung 18 zeigt die Wurzelkanaloberfläche des Zahnstücks 764b, das einen einwöchigen Infektionszyklus mit Bakteriensuspension durchlaufen hat. Die Probe ist an der Oberfläche dicht mit Mikroorganismen besiedelt, die Infektion ist gelungen. In Abbildung 19 werden die Dentintubuli im Längsschnitt dargestellt: die Aufnahme erfolgte an den Bruchkanten, die beim Spalten des Zahnstücks entstanden sind. Die Bakterien haften nicht nur an der Wurzelkanaloberfläche, sondern sind auch in tiefer liegende Dentinschichten eingewandert. Sie sind kettenartig entlang der Dentintubuli angeordnet.

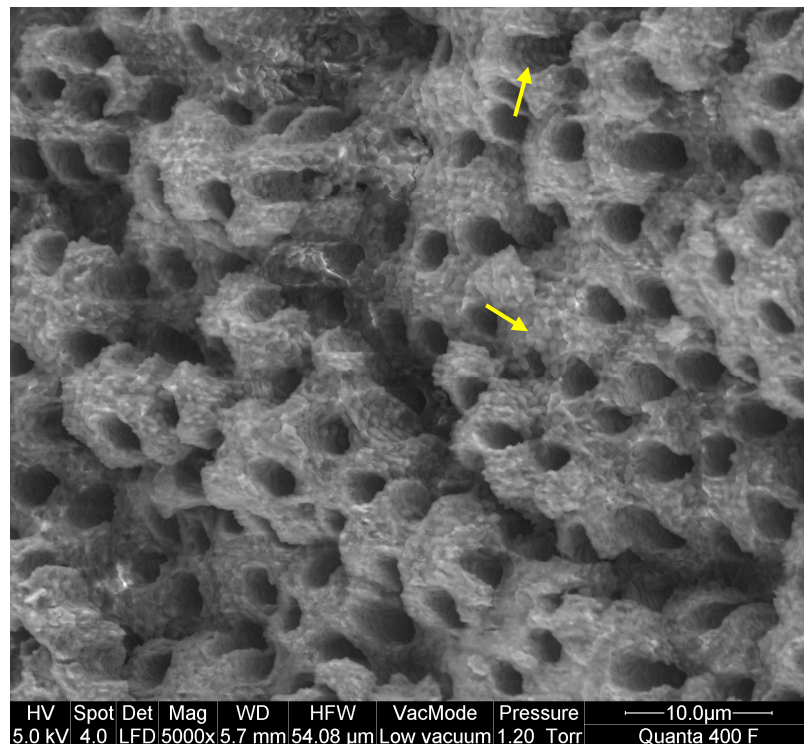


Abbildung 18: Zahn 764 nach Durchlaufen eines einwöchigen Versuchszyklus mit Bakteriensuspension (Infektionskontrolle); die Kanaloberfläche ist dicht mit Mikroorganismen (→) besiedelt

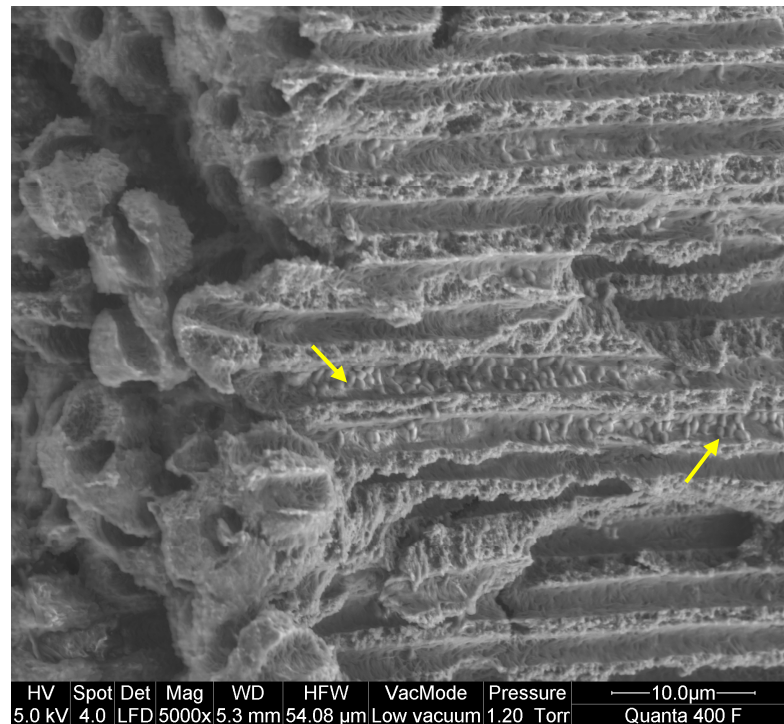


Abbildung 19: Zahnstück 764b im Längsschnitt; die Bakterien (→) sind in die Dentintubuli eingewandert

Abbildung 20 und 21 zeigen Aufnahmen des Zahnstückes 761c, welches nach der einwöchigen Infektion mit dem Bakterium *Enterococcus faecalis* schließlich 60 sec lang mit 3%igem NaOCl desinfiziert wurde. Am Ende der Einwirkzeit wurde das Agens wie beschrieben mit Natriumthiosulfat abgestoppt. Je nach Lokalisation im Wurzelkanal sind vereinzelte Bakterien sowohl an der Oberfläche als auch in den Dentintubuli zu erkennen.

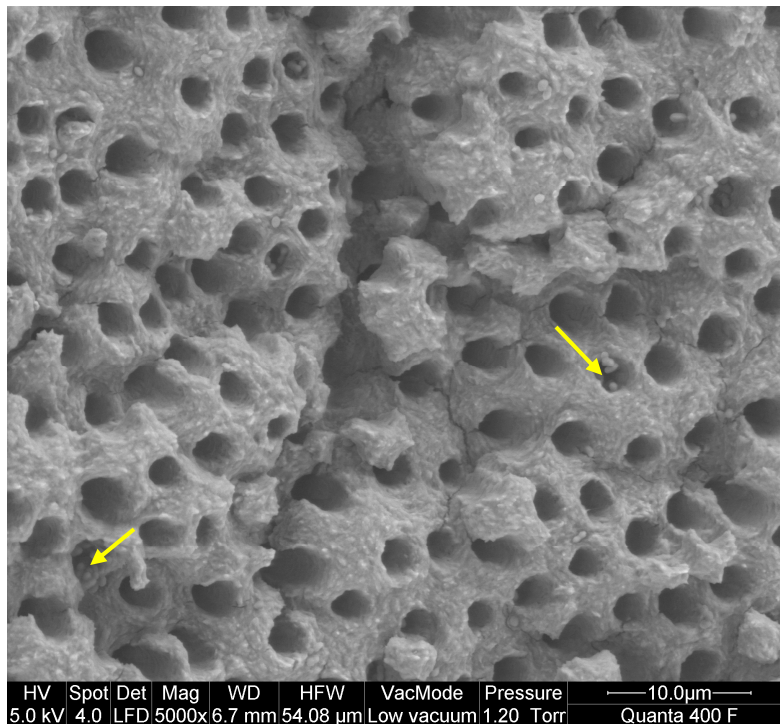


Abbildung 20: Zahnstück 761c nach Desinfektion (3%iges NaOCl für 60sec im Wurzelkanal belassen, dann gestoppt); vereinzelt Bakterien (→) auf der Dentinoberfläche

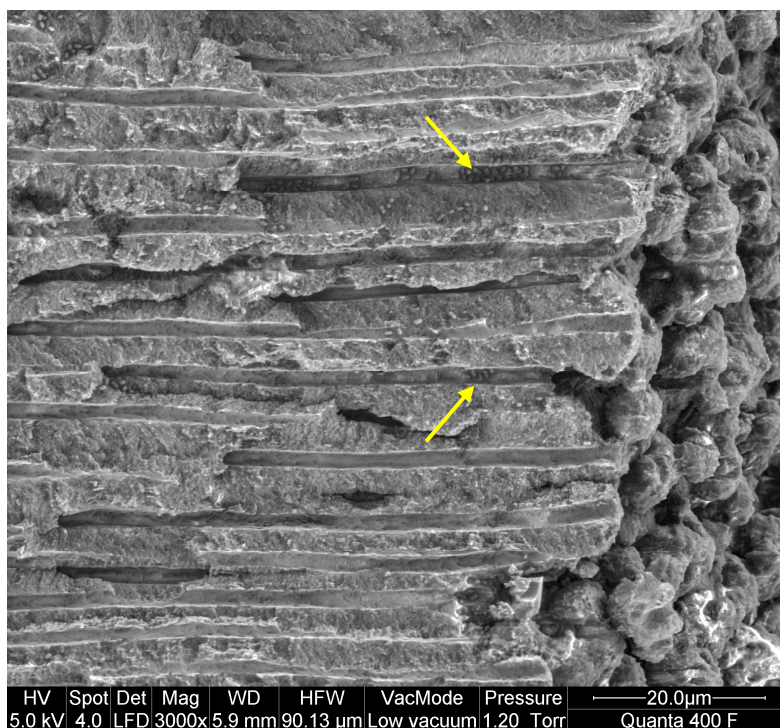


Abbildung 21: Zahnstück 761c im Längsschnitt; Bakterien (→) in den Dentintubuli

Zum Vergleich wurde das Zahnstück 768c ebenfalls mit 3%igem NaOCl für 60 sec desinfiziert, allerdings wurde hier das Agens nach Ablauf der Einwirkzeit nicht mit Natriumthiosulfat inaktiviert. Somit sollte ein Nachwirken des Desinfektionsmittels simuliert werden. Bei der Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Bilder dieses Wurzelstückes konnte festgestellt werden, dass auch nach ungestoppter Desinfektion vereinzelte Bakterienkolonien vorhanden waren (vgl. Abb. 22). Dabei war, wie bei Zahnstück 761c, die Kontamination mit *E. faecalis* je nach Lokalisation im Wurzelkanal unterschiedlich stark.

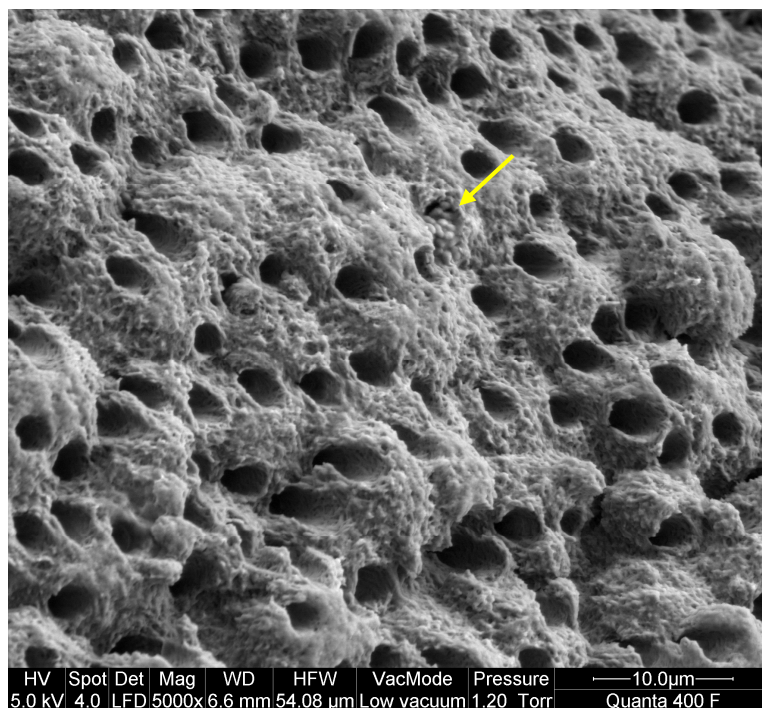


Abbildung 22: Zahnstück 768c nach Desinfektion (3%iges NaOCl für 60sec im Wurzelkanal belassen, ungestoppt); vereinzelt Bakterien (→) auf der Dentinoberfläche

5.4. Ergebnis der Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden-Testung

Es zeigte sich sowohl auf den Typticase-Soy-Broth-Agarplatten als auch auf den Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden für alle Verdünnungen ein identisches Wachstum von *E. faecalis*. So ergab beispielsweise die Zählung der koloniebildenden Einheiten bei der 1:100000-Verdünnung auf den Casoplaten 644 Kolonien, auf den Enterokokkenplatten wurden 622 Kolonien vermerkt. Gemäß der Beschreibung des Selektivnährbodens hatten sich bei den Enterokokkenplatten um die Bakterienkolonien herum schwarze Höfe gebildet (vgl. auch Abb. 23 auf Seite 53).

6. Diskussion

6.1. Das Testmodell und seine Durchführung

In Anlehnung an die vorangegangene Studie [33] wurden auch bei der vorliegenden Weiterentwicklung des Testmodells bovine Zähne verwendet. Der Einsatz von Rinderzähnen bewährte sich auch in anderen *in vitro* Modellen, in denen ein Ersatz für humane Zahnhartsubstanzen benötigt wurde, da sie in ihren morphologischen Eigenschaften menschlichen Zähnen sehr ähnlich sind und darüber hinaus leicht und in großer Zahl beschafft werden können [26; 64; 66]. Man verwendete den *Enterococcus faecalis* als Testbakterium, da er eine wesentliche Rolle bei fehlgeschlagenen Wurzelbehandlungen spielt [30; 53; 57; 74; 81] und seine Kultivierung und Handhabung im Labor durch seine umwelttoleranten Eigenschaften relativ einfach ist. Die Infektionszeit der Zahnstücke mit dem Mikroorganismus lag in unserem Versuchsaufbau bei sieben Tagen. In anderen Studien infizierte man die Prüfkörper mit unter deutlich länger [32; 74], teilweise bis zu vier Wochen [32]. Betrachtet man allerdings die Ergebnisse der Infektionskontrollen unter 5.1.2., kann durchaus von einer effektiven Infektion gesprochen werden. Eine ausreichende Kontamination der zu desinfizierenden Proben mit dem Testbakterium war zu jeder Zeit gewährleistet. Dies verdeutlichte auch die elektronenmikroskopische Darstellung.

Ziel dieser Arbeit war, ein bereits bestehendes *in vitro* Modell zur Testung von endodontischen Desinfektionsmethoden [33] weiterzuentwickeln. Mit Hilfe des autoklavierbaren, im Mikrometerbereich justierbaren Bohrständers konnten exakt gleiche Volumina an Bohrspanproben aus den Wurzelkanälen der Rinderinzisivi entnommen werden. Zusätzlich erlaubte die Bohrmethode auch eine Untersuchung tieferer Dentinschichten auf Kontamination mit dem verwendeten Mikroorganismus. In den Infektionskontrollen war dadurch tendenziell ein fallendes Tiefenprofil zu beobachten: Die Wurzelkanaloberfläche war etwas dichter mit Bakterien besiedelt als die tieferen Schichten des Dentins; es konnte jedoch keine statistische Signifikanz herausgearbeitet werden. Normalerweise würde man erwarten, dass in tieferen Schichten deutlich weniger Bakterien vorhanden sind, da laut SEN *et al.* [67] die Eindringtiefe von Kokken und Stäbchen in die Dentintubuli auf 150 µm limitiert ist. Dieser Diskussionspunkt war bereits aus der Vorgängerarbeit [33] bekannt, weshalb wir den Bohrvorgang deutlich modifiziert haben. So sollte eine Zwischenbohrung mit einem größeren Rosenbohrer verhindern, dass durch

stetiges Tiefergehen ein Bohrkanal entsteht, in welchem sich Späne sammeln können. Dies würde beim Abspülen der Wurzelstücke zu verfälschten Ergebnissen führen. Der größere Rosenbohrer (Durchmesser: 2,1 mm) wurde daher nach der Probenentnahme mit Hilfe des kleineren Bohrers (Durchmesser: 0,8 mm) verwendet, um eine Art Plateau zu schaffen, damit nicht aufgesammelte Späne mit Kochsalzlösung weggespült und somit verworfen werden konnten. Trotz dieses Mehraufwandes war ein statistisch signifikantes Tiefenprofil nicht erkennbar. Der Abspülvorgang ist hierbei ein kritischer Arbeitsschritt im Versuch. Auch bei sorgfältigster Arbeitsweise können nie alle in Lösung gegangenen Späne aufgesammelt werden, da sowohl am Zahnstück als auch in der Petrischale selbst immer kleine Mengen zurück bleiben.

Vergleichsweise werden aber in zahlreichen anderen Studien, insbesondere bei *in vivo* Untersuchungen, lediglich Proben von der Wurzelkanaloberfläche genommen. Die Ermittlung der bakteriellen Kontamination erfolgte häufig durch einfache Abstriche mittels steriler Papierspitzen [53; 54; 74]. Auch eine Überführung der desinfizierten Prüfkörper in Medium mit anschließender Bestimmung des Bakterienwachstums [18] oder der Einsatz endodontischer Feilen [44; 60] zur Abtragung infizierten Dentins wurden beschrieben. Eine mögliche bakterielle Kontamination von tiefliegenden Dentinschichten kann jedoch auf diese Weise nicht festgestellt werden.

6.2. Antibakterielle Wirkung des NaOCl

Eine Reduktion der bakteriellen Infektion um 3 \log_{10} Stufen im Sinne einer biologisch relevanten Desinfektion gemäß den Empfehlungen des Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) und des HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force [11] konnte in dieser Studie mit NaOCl als Desinfektionsagens nicht erreicht werden. Hierzu hätten letztendlich nur noch maximal 0,1% der anfänglichen bakteriellen Kontamination nachweisbar sein dürfen.

Die besten Desinfektionsergebnisse konnten mit NaOCl in einer 3%igen Lösung und einer Wirkdauer von 60sec erreicht werden. Hier waren in Bohrschicht 1 noch 1% der ursprünglich vorhandenen Bakterienkolonien zu finden, was einer biologisch relevanten Desinfektion am nächsten kommt. Ließ man das 3%ige NaOCl nur 30 sec einwirken, erhielt man mit 2% verbliebener Mikroorganismen einen ähnlichen Wert. Auch für andere Konzentrationen des

Agens kann festgestellt werden, dass die Effektivität des Desinfektionsmittels durch Erhöhung der Wirkdauer von 30 sec auf 60 sec nur unwesentlich steigt. In einzelnen Fällen war die Bakterienreduktion bei gleicher NaOCl-Konzentration für die kürzere Einwirkzeit sogar etwas größer, wobei aber die Unterschiede gering waren. Hier finden sich deutliche Parallelen zu den Ergebnissen der Vorgängerarbeit [33], in welcher ebenfalls NaOCl in Konzentrationen von 0,5%, 1% und 3% getestet wurde, wobei aber die gestoppten Einwirkzeiten 30 sec und 600 sec betrugen. Auch unter diesen Testbedingungen zeigte sich, dass eine Erhöhung der gestoppten Wirkdauer allein kaum zu verbesserten Desinfektionen führt. Somit kann gefolgert werden, dass ein längeres Nachwirken des Agens essentiell für eine signifikante Bakterienreduktion ist. Wenn das NaOCl wie in unserem Versuch mit Natriumthiosulfat abgestoppt und somit dieses Nachwirken unterbunden wird, ist die Desinfektion, weitgehend unabhängig von der gestoppten Einwirkzeit, biologisch nicht relevant.

Betrachtet man den Einfluss der Konzentration des Agens, sieht man im Ergebnisteil unter 5.2., dass 3%iges NaOCl für beide Desinfektionszeiten die besten Ergebnisse lieferte. Wenn man allerdings die Ergebnisse bei 30 sec Einwirkzeit miteinander vergleicht, zeigen sich für die drei getesteten Konzentrationen recht ähnliche Werte. SIQUEIRA *et al.* [72] konnten in ihrer Untersuchung ebenfalls bei ihren Ergebnissen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Wirkung von NaOCl in Konzentrationen von 1%, 2,5% und sogar 5,25% gegen *E. faecalis* feststellen. Auch laut HÜLSMANN [35] wird die antibakterielle Wirkung von Natriumhypochlorit mit steigenden Konzentrationen nur geringfügig besser.

Bezüglich der Tiefenwirkung des NaOCl konnte bei den Auswertungen festgestellt werden, dass nach Desinfektion in der obersten Bohrschicht (0 - 0,5 mm) bei allen Versuchsgruppen weniger Bakterien nachzuweisen waren als in der tiefsten Schicht (1,0 - 1,5 mm). Allerdings war auch hier keine statistische Signifikanz zu erkennen. So waren beispielsweise nach der Desinfektion mit 0,5%igem NaOCl und 30 sec Einwirkzeit noch 8% der ursprünglich vorhandenen Bakterien in Bohrschicht 1 und 42% in Bohrschicht 3. Somit zeigte sich, dass das Agens an der Wurzelkanaloberfläche eine tendenziell bessere antibakterielle Wirkung hatte als in tieferen Dentinschichten, wobei die Reduktionsrate der Mikroorganismen in der tiefsten Schicht recht gering war. War die Konzentration des Agens allerdings höher, konnte eine stärkere Bakterienelimination in der tiefsten Bohrschicht erreicht werden. Bei ebenfalls

30 sec Wirkdauer verblieben bei der Anwendung von 3%igem Hypochlorit nur noch 4% der Mikroorganismen in Bohrschicht 3. In Anlehnung an die Studie von ZOU *et al.* [85] (siehe auch Kap. 2.1.3.) konnte also festgestellt werden, dass mit steigender Konzentration des Desinfektionsmittels eine tendenziell bessere Tiefenwirkung erreicht werden konnte. Allerdings kamen ZOU *et al.* bei ihrer Untersuchung auch zu dem Schluss, dass NaOCl selbst bei erhöhter Temperatur (45 °C), hoher Konzentration (6%) und langer Einwirkzeit (20 min) nur 300 µm weit in die Dentintubuli eindringen konnte.

6.3. Vergleich der beiden Parallelprojekte

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die vorliegende Arbeit Teil eines Parallelprojekts. Im Zuge dessen wurde am gleichen *in vitro* Modell neben Natriumhypochlorit auch die Wirkung der antibakteriellen Photodynamischen Therapie auf *E. faecalis* untersucht. Hierbei kam das System PACT (cumdente, Tübingen) in Kombination mit Toluidinblau als zugehöriger Photosensitizer zum Einsatz. Für den Desinfektionsvorgang ließ man den Farbstoff eine Minute einwirken und aktivierte diesen anschließend durch eine 4 min bzw. 6 min lang dauernde Belichtung.

Auch in der parallel durchgeführten Arbeit [21] zeichnete sich bei den Infektionskontrollen die Tendenz zum fallenden Tiefenprofil ab, die oberflächlichste Dentinschicht war etwas stärker mit Mikroorganismen besiedelt als die beiden tieferen Dentinschichten. Im Hinblick auf die Desinfektion konnte auch mit der aPDT unter den beschriebenen Bedingungen keine biologisch relevante Desinfektion von mindestens 3 log₁₀ Stufen erreicht werden. In der obersten Bohrschicht verblieben nach 4 min Belichtungszeit 7% bzw. nach 6 min 9% der anfänglichen Anzahl an Kolonien. Im Vergleich dazu konnten bei Anwendung von 3,0%igem NaOCl und einer Einwirkzeit von 60 sec nur noch 1% der ursprünglich vorhandenen Bakterien gefunden werden. Somit erreichte man mit 3,0%igem NaOCl innerhalb einer kürzeren Behandlungsdauer ein besseres Desinfektionsergebnis.

6.4. Unterbindung der *Bacillus subtilis* Kontamination der Agarplatten

Während der Vorversuche konnte auf den Casoplatten, auf denen die Bohrspansuspensionen anfangs ausplattiert wurden, neben dem *E. faecalis* das Wachstum eines weiteren Mikroorganismus beobachtet werden. Dies führte dazu, dass die

gewonnenen Proben nicht mehr ausgewertet werden konnten. Zu Bestimmungszwecken wurde daher eine der kontaminierten Platten im Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg untersucht. Die Keimbestimmung ergab neben den verwendeten Enterokokken die Anwesenheit des aerob wachsenden Sporenbildners *Bacillus subtilis*. Dieses Bakterium ist in der Lage, gegenüber Umwelteinflüssen sehr robuste Endosporen zu bilden, weshalb mit gängigen Desinfektions- und Sterilisationsverfahren eine Inaktivierung des Bakteriums nicht gelingt [17; 20; 45; 70].

Die im Versuch verwendeten Rinderzähne waren von Natur aus, bedingt durch die Nahrung der Rinder, mit *Bacillus subtilis* kontaminiert. Dies stellte sich in der mikrobiologischen Untersuchung heraus. In Zusammenhang mit der beschriebenen Sporenbildung des Mikroorganismus erklärt sich sein Vorhandensein trotz der Autoklavierung der Zahnstücke. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, wurden in den Versuchen Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden verwendet. Diese sind gemäß ihrer Beschreibung [55] für den Nachweis von Enterokokken geeignet, wobei sie durch die Substanzen Kanamycin und Natriumazid das Wachstum von *Bacillus subtilis* ATCC 6633 sowie *Escherichia coli* ATCC 25922 unterbinden (= Negativkontrolle). Durch ein doppeltes Indikatorsystem wird das Wachstum von Äsculin-hydrolysierenden Streptokokken angezeigt, wobei sich Höfe aus schwarzen Eisen-Phenol-Komponenten bilden. So konnte das Wachstum des Endosporenbildners vollständig unterbunden werden, ein Auszählen der Kolonien war uneingeschränkt möglich. Durch die unter 4.12. beschriebenen Versuche konnte von einem gleichen Wachstum des *E. faecalis* auf beiden Plattenarten ausgegangen werden. Überlegungen, eine antibiotische Vorbehandlung der Rinderzähne durchzuführen oder das verwendete Nährmedium mit Kanamycin anzureichern, wurden daher als nicht notwendig erachtet und verworfen. Zur Dokumentation wurden Fotos der Infektionskontrolle b des Zahnstückes 763 erstellt, um das *E. faecalis* Wachstum auf den Enterokokkenplatten einerseits und das *B. subtilis* Wachstum auf den Casoplatten andererseits zu veranschaulichen (vgl. Abb. 23).

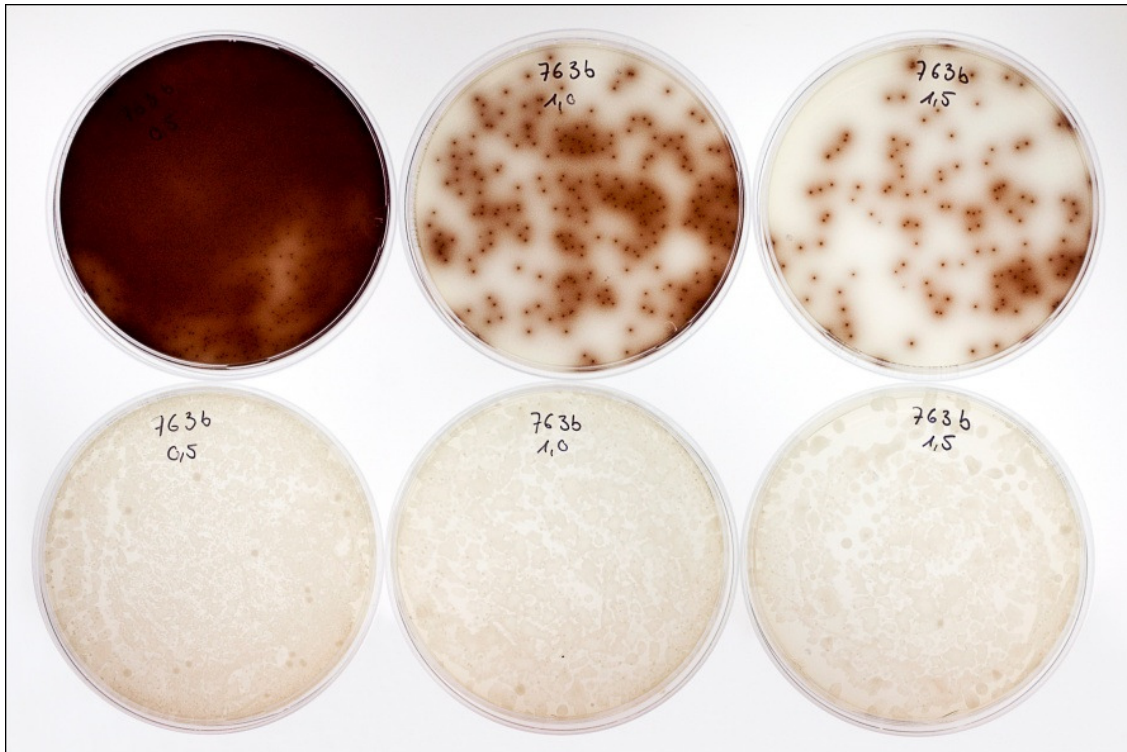


Abbildung 23: Vergleich der Enterokokken-Platten (Reihe oben) mit den in früheren Versuchen verwendeten Caso-Platten (Reihe unten); ausplattiert wurden Proben einer Infektionskontrolle: auf den Enterokokken-Platten wächst lediglich der *E. faecalis*, seine Stoffwechselprodukte zeichnen sich als braune Höfe um die Kolonien ab; auf den Caso-Platten ist das Wachstum des *E. faecalis* durch die starke *B. subtilis* Kontamination nicht mehr zu erkennen. Auf den Enterokokken-Platten ist in diesem Beispiel auch das fallende Tiefenprofil der unterschiedlichen Bohrschichten angedeutet: oben links stellt das Ausmaß der Infektion der obersten Bohrschicht, oben rechts das der tiefsten Bohrschicht dar

7. Zusammenfassung

Es wurde ein bereits bestehendes *in vitro* Modell weiterentwickelt, mit dem die Wirksamkeit unterschiedlicher endodontischer Desinfektionsmethoden an künstlich infizierten Rinderzahnwurzeln getestet werden kann. Die Proben wurden für eine Woche mit dem Bakterium *Enterococcus faecalis* infiziert. Für die Desinfektion verwendete man ausschließlich NaOCl in den Konzentrationen 0,5%, 1% und 3%. Die Einwirkzeiten betrugen 30 sec und 60 sec, wobei sofort im Anschluss eine Inaktivierung des NaOCl mit Natriumthiosulfat erfolgte, um ein Nachwirken des Agens zu unterbinden. Somit wurden nur gestoppte Desinfektionen durchgeführt.

Anhand des optimierten Modells sollte versucht werden, ein Tiefenprofil der mit dem Testmikroorganismus besiedelten Dentintubuli darzustellen. Mit einem selbst entwickelten, vollständig autoklavierbaren Bohrständler gelang es, Bohrspanproben definierter Volumina aus drei unterschiedlich tiefen Schichten des Wurzeldentins zu entnehmen. Die Bohrschichten besaßen jeweils eine Dicke von 0,5mm und lagen im Wurzeldentin in den Intervallen]0; 0,5] mm,]0,5; 1,0] mm und]1,0; 1,5] mm. Die aus dem Wurzeldentin isolierten Bohrspäne wurden in je 2 ml sterilem Medium aufgefangen und anschließend 100 µl der gewonnenen Bohrspan suspension auf Enterokokkenplatten ausplattiert. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Auswertung anhand der gezählten kolonienbildenden Einheiten. Die Auswertung erfolgte für die Infektionskontrollen durch Darstellung der absoluten Koloniezahlen und für die Desinfektionsprüfkörper durch Angabe der verbliebenen Bakterien nach Desinfektion in Prozent. Hierbei war jeder Zahn seine eigene Kontrolle.

Mit Hilfe des so durchgeführten Bohrvorgangs war es möglich, ein Tiefenprofil mit fallender Tendenz in den Infektionskontrollen darzustellen. Man hielt fest, dass sich in oberflächlichen Dentinschichten mehr Bakterien befanden, als in den tieferen Dentinschichten. Die Unterschiede bewegten sich innerhalb einer bis zwei \log_{10} Stufen.

Eine biologisch relevante Desinfektion durch die Herabsetzung der anfänglichen Bakterienkontamination um 3 \log_{10} Stufen konnte in keinem Versuch erzielt werden. Die höchste antimikrobielle Wirkung konnte mit 3%igem NaOCl und einer Einwirkzeit von 60 sec erreicht werden. Hier fand man nur noch 1% der ursprünglich vorhandenen Bakterien.

Allerdings zeigte sich, dass es bei den durchgeführten gestoppten Versuchen für die beiden Einwirkzeiten kaum Unterschiede bei den Ergebnissen gab.

Um eine Kontamination der Agarplatten mit *Bacillus subtilis*, ein natürlicherweise im Rinderzahn vorkommender aerob wachsender Sporenbildner, zu vermeiden, entschied man sich für die Verwendung von speziellen Enterokokkenplatten. Der anfänglich verwendete Trypticase-Soy-Broth-Agar erlaubte das Wachstum des sterilisationsunempfindlichen Sporenbildners auf den Platten, wodurch die Ergebnisse unbrauchbar wurden. Durch die Verwendung von selektiven Enterokokken-Platten konnte eine problemlose Auswertung des *E. faecalis* Wachstums stattfinden.

8. Anhang

8.1. Labormaterialien und Reagenzien

Bakterien

Enterococcus faecalis ATCC 29212, bezogen vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg

Agar

Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar (KAA-Agar), bezogen vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg

42,7 g werden in 1 Liter Aqua dest. suspendiert, bis zum vollständigen Lösen erhitzt und 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Typische Zusammensetzung in g pro 1 Liter Nährmedium:

- Caseinpepton 20,0 g
- Hefeextrakt 5,0 g
- Natriumchlorid 5,0 g
- Äsculin 1,0 g
- Natriumcitrat 1,0 g
- Ammoniumeisen(III)-citrat 0,5 g
- Natriumazid 0,15 g
- Kanamycinsulfat 0,02 g
- Agar 10,0 g

Gesamtmenge 42,7g

Arbeitsschutz

Handschuhe: Sempermed, Semperit Technische Produkte (Wien, Österreich)

Mundschutz: Sentinex Lite El, Lohmann & Rauscher (Neuwied)

Handdesinfektion: Sterillium, Bode Chemie (Hamburg)

Flächendesinfektion: Ethanol 70%, Chemikalienausgabe Universität Regensburg

Aufbewahrung

Bechergläser: Schott Duran, Schott (Mainz)

Laborkühlschrank: FKS5002, Liebherr (Bulle, Schweiz)

Tiefkühlschrank: Forma -86 Freezer, Thermo Electron Corp. (Marietta, USA)

Messgeräte

Photometer: Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences (Little Chalfont, GB)

Küvetten: 1,5 halbmikro Küvetten, 12,5mmx12,5mmx45mm, Brand (Wertheim)

Messpipetten: Eppendorf (Hamburg)

Multi-Pipette: Eppendorf (Hamburg)

Analysenwaage: Sartorius (Göttingen)

Accu-Jet[®] pro: Brand (Wertheim)

Zahnstückeherstellung

Schlachthof: Schlachthof Vion (Furth im Wald)

Sägemikrotom: 1600 Leitz (Wetzlar)

Mikromotor: K9, KAVO (Biberach/Riß)

Handstück: 10A KAVO Handstück 180C (Biberach/Riß)

Trennscheibe: Artikelnummer 196 090, Komet (Lemgo)

Wachsmesser: Artikelnummer 9001650, Henry Schein Dental Depot (Langen)

Chemikalien

Natriumhypochlorit 0,5%, 1% und 3% Apotheke der Universität Regensburg

Natriumthiosulfat-Pentahydrat 72050 puriss.p.a.cryst., Fluka (Buchs, Schweiz)

Natriumchlorid: Artikelnummer 1.06406.1000, Merck (Darmstadt)

Typticase-Soy-Broth: Becton & Dickinson (Sparks, USA)

Hefeextrakt: Bacto Yeast Extract, Becton & Dickinson (Sparks, USA)

Chloramin T Lösung: Artikelnummer 1.02426, Merck (Darmstadt)

Glycerin 87%: Merck (Darmstadt)

Glutaraldehyd für Elektronenmikroskopie 2,5%, Nr. 23114, Serva (Heidelberg)

Sørensen-Phosphat-Puffer 0,1 M: aus Sørensen-Phosphat-Puffer 0,2 M mit Aqua bidest. 1:1 mischen

Herstellung des Sørensen-Phosphat-Puffer 0,2 M

für 500 ml:

- 150 ml aus Lösung A:
13,61 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) in 500 ml Aqua bidest. lösen
- 850 ml aus Lösung B:
14,19 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) in 500 ml Aqua bidest. lösen

KH_2PO_4 : Artikelnummer 4873, Merck (Darmstadt)

Na_2HPO_4 : Artikelnummer 6586, Merck (Darmstadt)

Herstellung der Fixierung für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

für 50 ml:

- 25 ml 0,2 M Sørensen-Phosphat-Puffer
- 20 ml Aqua Millipore
- 5 ml 2,5% Glutaraldehyd

Verbrauchsmaterialien

PalaDur Autopolymerisat: Heraeus-Kulzer (Hanau)

RelyXUnicem: 3M ESPE (Neuss)

Exstirpationsnadeln: ISO-Größe 35, VDW-Dental GmbH (München)

Zellstofftücher: Mehrzwecktücher, Novotex (Krefeld)

Petrischalen: Gr. 94/16 und Gr. 60/15 steril, Cellstar Greiner bio-one (Frickenhausen)

Eppendorfcups: Eppendorf (Hamburg)

Falcon tubes: 15 ml PP-Test tubes, 50 ml tubes, Cellstar Greiner bio-one (Poitiers, Frankreich)

Cryos: Cellstar Greiner bio-one (Poitiers, Frankreich)

Deckgläser: 15x15 Superior, Marienfeld (Königshofen)

Bohrer: 0,8 mm & 2,1 mm Rosenbohrer, Komet (Lemgo)

Wellplatten: Tissue Culture Cluster 12, Costar (Cambridge, USA)

Pipettenspitzen: 30 µl, 200 µl, 1000 µl, Sarstedt (Nümbrecht)

Stripetten: Cellstar greiner bio-one (Frickenhausen)

Skalpell: Feather Safety Razor Co. (Osaka, Japan)

Heißklebesticks: NO28194, Proxxon (Niersbach)

Parafilm: Pechiney (Düsseldorf)

10 ml-Spritzen: BD 10 ml Syringe, BD (Franklin Lakes, USA)

Kanülenaufsätze: Miraject PL Super, Hager & Werken (Duisburg)

Aluminium Stub: Provac (Oestrich-Winkel)

Leit-C-Plast: Provac (Oestrich-Winkel)

Sonstige Geräte

MilliQUFplus: Millipore (Molsheim, Frankreich)

Sterile Werkbank HF48: GelaireFlow Laboratories (Opera, Italien)

Zentrifuge: Universal 320, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

Polymerisationslampe: Optilux 400, Demetron (Danbury, USA)

Bohrständer: Mechanikwerkstatt Biologie der Universität Regensburg

Heißklebepistole: HKP220, Proxxon (Niersbach)

Autoklav: Fedegari Autoclavi (Albuzzano, Italien)

Drigalski-Spatel Edelstahl rostfrei, Lieferant VWR-Versand

Rüttler: IKA-Vibaax-VXR, Janke & Kunkel GmbH (Staufen)

Kapselanmischgerät: Silamat S3, Vivadent (Schaan, Fürstentum Liechtenstein)

Inkubator: B5060, Heraeus (Hanau)

Vortex: REAX2000, Heidolph (Schwabach)

Rasterelektronenmikroskop: FEI Quanta 400 FEG, FEI Deutschland GmbH (Frankfurth/Main)

Graphische Darstellung und statistische Auswertung

Sigma Plot Version 8.0, SPSS Inc. (Chicago, USA)

SPSS Version 18.0, SPSS Inc. (Chicago, USA)

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Synthese von Natriumhypochlorit aus Chlorgas und Natronlauge	S. 5
Abbildung 2: Synthese von Natriumthiosulfat aus Natriumsulfit und Schwefel	S. 17
Abbildung 3: Das Sägemikrotom zum Schneiden der Zahnstücke	S. 25
Abbildung 4: Mit Kunststoff gesockelter Rinderzahn	S. 25
Abbildung 5: Zahnschema	S. 26
Abbildung 6: Die drei Zahnstücke des Zahnes 767 in sterilem Medium	S. 26
Abbildung 7: Drei Zahnstücke eines Rinderzahnes in Petrischalen geklebt	S. 28
Abbildung 8: Desinfektionsvorgang	S. 32
Abbildung 9: Detailansicht der Befüllung des Wurzelkanals mit NaOCl	S. 32
Abbildung 10: Der selbst entwickelte, voll autoklavierbare Bohrstander	S. 33
Abbildung 11: Eine Zahnstückhälfte kurz vor dem Bohrvorgang	S. 34
Abbildung 12: Illustrierter Bohrvorgang	S. 35
Abbildung 13: Der Bohrvorgang	S. 36
Abbildung 14: Abspülen der Bohrspäne vom Zahnstück in die Petrischale	S. 36
Abbildung 15: Bohrspanproben in sterilem Medium	S. 37
Abbildung 16: Anzahl der <i>E. faecalis</i> Kolonien in den Infektionskontrollen	S. 41
Abbildung 17: Relative Kolonienzahlen nach der Desinfektion für 30 sec bzw. 60 sec	S. 42
Abbildung 18: Zahn 764 nach Durchlaufen eines einwöchigen Versuchszyklus	S. 44
Abbildung 19: Zahnstück 764b im Längsschnitt	S. 45
Abbildung 20: Zahnstück 761c nach Desinfektion	S. 46
Abbildung 21: Zahnstück 761c im Längsschnitt	S. 46
Abbildung 22: Zahnstück 768c nach Desinfektion	S. 47
Abbildung 23: Vergleich der Enterokokken-Platten mit den Caso-Platten	S. 53

8.3. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
a	Sterilkontrolle
aPDT	antibakterielle Photodynamische Therapie
b	Infektionskontrolle
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Desinfektionsprüfkörper
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
Ca(OH) ₂	Calciumhydroxid
Cl ₂	Chlorgas
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cm	Zentimeter
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
g	Gramm
gram-	gramnegativ
gram+	grampositiv
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
l	Liter
m	Meter

M	molar
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MTAD	MT Initiale des Entwicklers, T Tetracylin; A acid; D Detergens
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorit
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ SO ₃	Natriumsulfit
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat als Pentahydrat
nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
S	Schwefel
sec	Sekunde
spp.	species pluralis
u.a.	unter anderem
ve	voll entsalzen
z.B.	zum Beispiel

9. Literaturverzeichnis

1. Abdullah M, Ng Y, Gulabivala K, Moles D, Spratt D: Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005, 31: 30–36.
2. Aggarwal R, Goel N, Chaudhary U, Kumar V, Ranjan K: Evaluation of microbiocidal activity of superoxidized water on hospital isolates. *Indian J Pathol Microbiol* 2010, 53: 757–759.
3. Al-Ahmad A, Müller N, Wiedmann-Al-Ahmad M, Sava I, Hübner J, Follo M, Schirrmeister J, Hellwig E: Endodontic and salivary isolates of *Enterococcus faecalis* integrate into biofilm from human salivary bacteria cultivated in vitro. *J Endod* 2009, 35: 986–991.
4. Al-Jadaa A, Paqué F, Attin T, Zehnder M: Necrotic pulp tissue dissolution by passive ultrasonic irrigation in simulated accessory canals: impact of canal location and angulation. *Int Endod J* 2009, 42: 59–65.
5. Arias C, Contreras G, Murray B: Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin. Microbiol. Infect* 2010, 16: 555–562.
6. Arias-Moliz M, Ferrer-Luque C, Espigares-García M, Baca P: *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod* 2009, 35: 711–714.
7. Baumann M: Endodontie: Rückblick und Ausblick. *Endodontoe Journal* 2002: 10–17.
8. Baumann M, Arnold M: Endodontologie. 24 Tabellen. Thieme, Stuttgart [u.a.] 2008
9. Bernhardt J: *Bacillus subtilis* - Beschreibung und Charakterisierung. <http://microbio1.biologie.uni-greifswald.de:8080/institute/85>. 2000
10. Bonsor S, Nichol R, Reid T, Pearson G: An alternative regimen for root canal disinfection. *Br Dent J* 2006, 201: 101–105.
11. Boyce J, Pittet D: Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002, 23: S3–40.
12. Chang Y, Huang F, Tai K, Chou M: The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001, 92: 446–450.
13. Christensen C, McNeal S, Eleazer P: Effect of lowering the pH of sodium hypochlorite on dissolving tissue in vitro. *J Endod* 2008, 34: 449–452.
14. Cicone J, Petronis J, Embert C, Spector D: Successful treatment of calciphylaxis with intravenous sodium thiosulfate. *Am. J. Kidney Dis* 2004, 43: 1104–1108.
15. Clarkson R, Moule A: Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. *Aust Dent J* 1998, 43: 250–256.
16. Dahlén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C: Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol. Immunol* 2000, 15: 309–312.
17. Driks A: The bacillus spore coat. *Phytopathology* 2004, 94: 1249–1251.
18. Dumanı A, Yoldas O, Isci A, Köksal F, Kayar B, Polat E: Disinfection of artificially contaminated Resilon cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite at different time exposures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007, 103: e82–5.

19. Dunavant T, Regan J, Glickman G, Solomon E, Honeyman A: Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006, 32: 527–531.
20. Epstein A, Pokroy B, Seminara A, Aizenberg J: Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2011, 108: 995–1000.
21. Erb S: Desinfektion artifiziell infizierter Wurzelkanäle *in vitro* mittels antibakterieller photodynamischer Methoden. Dissertation in Vorbereitung, Universität Regensburg 2011, Lehrstuhl für Zahnerhaltung und Parodontologie.
22. Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gül K: Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: *in vivo* study. *J Endod* 2004, 30: 84–87.
23. Estrela C, Silva J, Alencar A, Leles C, Decurcio D: Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*—a systematic review. *J Appl Oral Sci* 2008, 16: 364–368.
24. Evans M, Davies J, Sundqvist G, Figdor D: Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002, 35: 221–228.
25. Figdor D, Sundqvist G: A big role for the very small—understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J* 2007, 52: S38–51.
26. Fonseca RB, Haiter-Neto F, Carlo HL, Soares CJ, Sinhoreti MA, Puppim-Rontani RM, Correr-Sobrinho L: Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. *Arch. Oral Biol* 2008, 53: 1023–1029.
27. Giardino L, Savoldi E, Ambu E, Rimondini R, Palezona A, Debbia E: Antimicrobial effect of MTAD, Tetraclean, Cloreximid, and sodium hypochlorite on three common endodontic pathogens. *Indian J Dent Res* 2009, 20: 391.
28. Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia E: Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 2007, 33: 852–855.
29. Gomes B, Pinheiro E, Jacinto R, Zaia A, Ferraz C, Souza-Filho F: Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod* 2008, 34: 537–540.
30. Gomes B, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ de: *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006, 102: 247–253.
31. Gregorio C de, Estevez R, Cisneros R, Paranjpe A, Cohenca N: Efficacy of different irrigation and activation systems on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals and up to working length: an *in vitro* study. *J Endod* 2010, 36: 1216–1221.
32. Harrison A, Chivatxaranukul P, Parashos P, Messer H: The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. *Int Endod J* 2010, 43: 968–977.
33. Hecker S: Desinfektion artifiziell infizierter boviner Wurzelkanäle *in vitro*. Dissertation, Universität Regensburg 2008, Lehrstuhl für Zahnerhaltung und Parodontologie.
34. Heidemann D, Baumann M: Endodontie. Elsevier, Urban & Fischer, München 2001 [erschienen 2005]

35. Hülsmann M: Probleme in der Endodontie. Prävention, Identifikation und Management. Quintessenz, Berlin 2007
36. Hülsmann M, Hahn W: Complications during root canal irrigation--literature review and case reports. *Int Endod J* 2000, 33: 186–193.
37. Kayaoglu G, Ørstavik D: Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med* 2004, 15: 308–320.
38. Kim Y, Moon J, Lee K, Chon N, Park H: The effects of probiotics on symptoms of irritable bowel syndrome. *Korean J Gastroenterol* 2006, 47: 413–419.
39. Konopka K, Goslinski T: Photodynamic therapy in dentistry. *J. Dent. Res* 2007, 86: 694–707.
40. Latscha H, Klein H: Anorganische Chemie. Mit 37 Tabellen. Springer, Berlin [u.a.] 2007
41. Leclercq R: Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Infect* 2009, 15: 224–231.
42. Lima K, Fava L, Siqueira J: Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *J Endod* 2001, 27: 616–619.
43. Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N: Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009, 107: 295–298.
44. Metzger Z, Better H, Abramovitz I: Immediate root canal disinfection with ultraviolet light: an ex vivo feasibility study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007, 104: 425–433.
45. Moesby L, Hansen E, Christensen J, Høyer C, Juhl G, Olsen H: Dry and moist heat sterilisation cannot inactivate pyrogenicity of Gram positive microorganisms. *Eur J Pharm Sci* 2005, 26: 318–323.
46. Motta M, Chaves-Mendonca M, Stirton C, Cardozo H: Accidental injection with sodium hypochlorite: report of a case. *Int Endod J* 2009, 42: 175–182.
47. Murray B: The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev* 1990, 3: 46–65.
48. Musso C, Enz P, Vidal F: Use of sodium thiosulfate in the treatment of calciphylaxis. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2009, 20: 1065–1068.
49. Nair P, Henry S, Cano V, Vera J: Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005, 99: 231–252.
50. Navarro-Escobar E, González-Rodríguez M, Ferrer-Luque C: Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010, 15: e90-4.
51. Neumeister B, Braun R, Kimmig P: Mikrobiologische Diagnostik. Thieme, Stuttgart 2009
52. Newberry B, Shabahang S, Johnson N, Aprecio R, Torabinejad M: The antimicrobial effect of biopure MTAD on eight strains of *Enterococcus faecalis*: an in vitro investigation. *J Endod* 2007, 33: 1352–1354.
53. Oliveira D, Barbizam J, Trope M, Teixeira F: In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007, 103: 702–706.

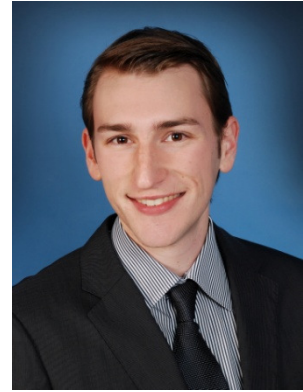
54. Onçağ O, Hoşgör M, Hilmioğlu S, Zekioğlu O, Eronat C, Burhanoglu D: Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 2003, 36: 423–432.
55. Oxoid-Nährmedien-Handbuch (Hrsg): Oxoid-Nährmedien-Handbuch (Hrsg). Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar (KAA-Agar), TN1217. Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar (KAA-Agar), TN1217. 2009
56. Ozbek S, Ozbek A, Erdorgan A: Analysis of *Enterococcus faecalis* in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR green method. *J Appl Oral Sci* 2009, 17: 370–374.
57. Pappen F, Qian W, Aleksejūniene J, Leonardo R, Leonardo M, Haapasalo M: Inhibition of sodium hypochlorite antimicrobial activity in the presence of bovine serum albumin. *J Endod* 2010, 36: 268–271.
58. Pascon F, Kantovitz K, Sacramento P, Nobre-dos-Santos M, Puppini-Rontani R: Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review. *J Dent* 2009, 37: 903–908.
59. Portenier I, Waltimo T, Haapasalo M: *Enterococcus faecalis* – the root canal survivor and ‘star’ in posttreatment disease. *Endodontic Topics* 2003, 6: 135–159 2003
60. Rôças I, Siqueira J: Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. *J Endod* 2011, 37: 143–150.
61. Rôças I, Siqueira J, Santos K: Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004, 30: 315–320.
62. Roth S, Feichtinger J, Hertel C: Characterization of *Bacillus subtilis* spore inactivation in low-pressure, low-temperature gas plasma sterilization processes. *J. Appl. Microbiol* 2010, 108: 521–531.
63. Saatchi M: Healing of large periapical lesion: a non-surgical endodontic treatment approach. *Aust Endod J* 2007, 33: 136–140.
64. Schilke R, Lisson J, Bauss O, Geurtsen W: Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch. Oral Biol* 2000, 45: 355–361.
65. Schirrmeister J, Liebenow A, Braun G, Wittmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A: Detection and eradication of microorganisms in root-filled teeth associated with periradicular lesions: an in vivo study. *J Endod* 2007, 33: 536–540.
66. Schmalz G, Hiller K, Nunez L, Stoll J, Weis K: Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod* 2001, 27: 23–30.
67. Sen B, Piskin B, Demirci T: Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol* 1995, 11: 6–9.
68. Sermeño R, da Silva L, Herrera H, Herrera H, Silva R, Leonardo M: Tissue damage after sodium hypochlorite extrusion during root canal treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009, 108: e46-9.
69. Sherman JM: The Enterococci and Related Streptococci. *J. Bacteriol* 1938, Band 35: 81–93.
70. Shigemoto M, Nakagawa K, Sakamoto J, Tsuchidoi T: Thermal death of *Bacillus subtilis* spores in oil-water systems. *Biocontrol Sci* 2010, 15: 27–31.

71. Siqueira J: Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001, 34: 1–10.
72. Siqueira J, Rôças I, Favieri A, Lima K: Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod* 2000, 26: 331–334.
73. Siqueira J, Rôças I, Riche F, Provenzano J: Clinical outcome of the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using an antimicrobial protocol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008, 106: 757–762.
74. Soares JA, Roque Carvalho MA de, Cunha Santos SM, Mendonça RM, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Júnior M, Magalhães PP, Santos MH, Macêdo Farias L de: Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 2010, 36: 894–898.
75. Sorokulova I, Kirik I, Pinchuk I: Probiotics against *Campylobacter* Pathogens. *J Travel Med* 1997, 4: 167–170.
76. Sorokulova IB, Pinchuk IV, Denayrolles M, Osipova IG, Huang JM, Cutting SM, Urdaci MC: The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. *Dig. Dis. Sci* 2008, 53: 954–963.
77. Sousa E, Ferraz C, Gomes B, Pinheiro E, Teixeira F, Souza-Filho F: Bacteriological study of root canals associated with periapical abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003, 96: 332–339.
78. Souza LC, Brito PRR, Oliveira JMC de, Alves FFR, Moreira ELJ, Sampaio-Filho HR, Rôças IN, Siqueira JF: Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010, 36: 292–296.
79. Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M: Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. *J Endod* 2010, 36: 1558–1562.
80. Tabbene O, Kalai L, Ben Slimene I, Karkouch I, Elkahoui S, Gharbi A, Cosette P, Mangoni ML, Jouenne T, Limam F: Anti-Candida effect of bacillomycin D-like lipopeptides from *Bacillus subtilis* B38. *FEMS microbiology letters* 2011, 316: 108–114.
81. Tirali R, Turan Y, Akal N, Karahan Z: In vitro antimicrobial activity of several concentrations of NaOCl and Octenisept in elimination of endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009, 108: e117–20.
82. Vankerckhoven V, Huys G, Vancanneyt M, Snauwaert C, Swings J, Klare I, Witte W, van Autgaerden T, Chapelle S, Lammens C, Goossens H: Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Appl. Environ. Microbiol* 2008, 74: 4247–4255.
83. Vianna M, Gomes B: Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009, 107: 585–589.
84. Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung G, Shen Y: Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *J Endod* 2010, 36: 1950–1955.

85. Zou L, Shen Y, Li W, Haapasalo M: Penetration of sodium hypochlorite into dentin. *J Endod* 2010, 36: 793–796.

10. Lebenslauf

Name: Thomas Andreas Mader
Geburtsdatum: 20. August 1985
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Dr. Gerhard Mader (Physiker)
Rosina Mader (Hebamme)
Anschrift: Richard-Riemerschmid-Allee 20
81241 München
E-Mail: mader.tom85@googlemail.com



Schulbildung:

September 1991 bis Juli 1995: Grundschule 1, Thalmassing
September 1995 bis Juni 2005: Gymnasium Neutraubling
Abitur: 2005

Studium (Zahnmedizin, Universität Regensburg):

Beginn: Oktober 2005
Vorphysikum: September 2006
Physikum: April 2008
Staatsexamen: von Juli bis November 2010
Approbation als Zahnarzt: im Dezember 2010

Aktuelle Tätigkeit:

Vorbereitungsassistent in der Praxis Dr. Pinder, Mammendorf (seit 01.04.2011)

11. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. G. Schmalz für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich ganz besonders bei Herrn Dr. K.-A. Hiller, der durch seine kompetente und engmaschige Betreuung und die Erstellung der Statistik maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen hat. Die während der Arbeit aufgetretenen Herausforderungen konnten dank seiner Hilfe stets bewerkstelligt und viele Ideen in die Tat umgesetzt werden.

Frau Dr. Stephanie Hecker möchte ich ebenfalls ganz besonders für ihre Unterstützung danken. Durch ihre freundliche und kompetente Einführung in das Thema sowie die weitere stetige Betreuung war ein gutes Vorankommen immer gegeben.

Auch Herrn Andreas Eidt möchte ich ganz herzlich danken. Er hat mich und meine Kollegin freundlich in sein Labor aufgenommen und uns immer mit Rat und Tat bei der Durchführung des praktischen Teils der Dissertation zur Seite gestanden. Dies gilt für das gesamte Team des Forschungslabors der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie. Durch ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft war das Arbeiten angenehm.

Vielen Dank auch an Frau Brigitte Bey für die gemeinsame Erstellung der raster-elektronenmikroskopischen Bilder.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Kollegin, Frau Stephanie Erb, bedanken. Durch ihre guten Ideen, ihre Kompetenz und ihren Fleiß war die gemeinsame Forschungsarbeit stets produktiv und hat mir Freude bereitet.

Ein weiterer Dank gilt meinen Freunden aus Schule und Studium sowie meinen lieben Bekannten und Freunden aus München. Selbst in den arbeitsintensivsten Momenten während der Ausbildung sowie der Dissertation kam ich durch unsere humorvolle, erholsame und aufbauende Freizeitgestaltung regelmäßig zu den notwendigen Pausen.

Auch meinen Verwandten aus der geliebten „Weite“ möchte ich danke sagen für all die erholsamen und schönen Tage, die ich während der Dissertationsarbeit und des gesamten

Studiums zusammen mit ihnen verbringen durfte. Die dadurch immer wieder neu erlangte Ruhe und Kraft war unerlässlich.

Abschließend, aber mit Sicherheit nicht zuletzt, möchte ich von ganzem Herzen meiner Familie danken. Beruflich wie privat haben mir meine Eltern und ganz besonders auch meine Schwester durch ihre Liebe und ihr Verständnis die nötige Unterstützung stets gegeben. Auch in den schwierigsten Momenten konnte ich mit ihrer Hilfe immer wieder neuen Mut fassen und meine Ziele verwirklichen. Deshalb möchte ich ihnen diese Arbeit voller Dankbarkeit widmen.